

Molekulare Analyse der sexuellen Entwicklung von
Aspergillus nidulans

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie der
Philipps-Universität
Marburg / Lahn
vorgelegt von

Mario Scherer
aus Zweibrücken

Marburg 2001

Molekulare Analyse der sexuellen Entwicklung von
Aspergillus nidulans

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie der
Philipps-Universität
Marburg / Lahn
vorgelegt von

Mario Scherer
aus Zweibrücken

Marburg 2001

vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation

angenommen am:

Tag der mündlichen Prüfung:

Erstgutachter: PD Dr. R. Fischer

Zweitgutachter: Prof. Dr. M. Bölker

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Februar 1998 bis März 2001 im Laboratorium für Mikrobiologie des Fachbereichs Biologie der Philipps-Universität Marburg und am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. R. K. Thauer und der Betreuung von PD Dr. R. Fischer durchgeführt.

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet und sämtliche Stellen, die im Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen sind, mit Quellenangaben kenntlich gemacht habe.

Marburg, im April 2001

Die Ergebnisse der Dissertation sind in folgenden Originalpublikationen veröffentlicht:

Scherer M., Fischer R., (1998). Purification and characterization of laccase II of *Aspergillus nidulans*. Archives of Microbiology 170:78-84.

Scherer M., Liese R., Fischer R., (2001). The tri-functional enzyme catalase-peroxidase (*cpeA*) is expressed during sexual development of *Aspergillus nidulans*.
In Vorbereitung

Wei H., Scherer M., Singh A., Liese R., Fischer R., (2001). *Aspergillus nidulans* α -1,3 glucanase (mutanase), *mutA*, is expressed during early stages of sexual development. In Vorbereitung.

Scherer M., Fischer R., (2001). Molecular characterization of a blue-copper laccase, TILA, of *Aspergillus nidulans*. FEMS Microbiological Letters. Im Druck.

Um die Sequenz des für Laccase II kodierenden Gens zu ermitteln, wurde untersucht, ob ein cDNA Fragment mit Homologie zu Laccasen, das in einer Datenbank eines *A. nidulans* Sequenzierprojektes identifiziert wurde, mit diesem Gen korrespondiert. Die vollständige Sequenz des zum Fragment gehörenden Gens zeigte jedoch, daß es für eine bisher nicht beschriebene Laccase kodiert. Die molekulare Analyse ergab, daß die TILA genannte Laccase keine spezifische Funktion in der sexuellen Entwicklung von *A. nidulans* hat. Die Ergebnisse aus den Untersuchungen zu TILA sind deshalb nur in Form einer Originalpublikation im Anhang dieser Arbeit dargestellt.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungen	1
I. Zusammenfassung	2
II. Einleitung	4
III. Material und Methoden	11
1. Chemikalien und Materialien	11
2. Verwendete Organismen und mikrobiologische Methoden	11
2.1 Organismen	11
2.2 Züchtung der Organismen	13
3. Genetische Methoden in <i>A. nidulans</i>	14
3.1 Kreuzungen von <i>A. nidulans</i> und Genotypen-Test	15
4. Molekularbiologische Methoden	16
4.1 Plasmide und Cosmide	16
4.2 Präparation und Restriktion von DNA	17
4.3 Gelelektrophorese von DNA	18
4.4 PCR	18
4.5 Isolierung von DNA aus Agarosegelen	19
4.6 Klonierung von DNA-Restriktionsfragmenten	20
4.7 DNA-Sequenzierung	20
4.8 Transfektion von <i>E. coli</i>	21
4.9 Transfektion von <i>A. nidulans</i>	21
4.10 DNA-DNA-Hybridisierung (Southern-Blot Analyse)	22
4.11 Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>A. nidulans</i>	22
4.12 DNA-RNA-Hybridisierung (Northern-Blot Analyse)	23
4.13 Herstellung eines Fusionskonstrukts von CPEA und GFP	24
4.14 Konstrukte zur Überexpression von <i>nsdD</i> und <i>edrA</i>	24
4.15 Herstellung von Konstrukten zur Deletion von STUA-Bindestellen im <i>cpeA</i> -Promotor	25
4.16 Herstellung einer subtraktiven cDNA-Bank	26
4.17 Überprüfung der Subtraktionseffizienz mittels South-Northern-Blot	28
5. Biochemische Methoden	29
5.1 Proteinbestimmung	29
5.2 SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	29
5.3 Immundetektion von Proteinen (Western-Blot Analyse)	30
5.4 Reinigung von CPEA	31
6. Mikroskopische Methoden	34

IV. Ergebnisse	35
1. Molekulare Analyse von <i>cpeA</i>	35
1.1 Ermittlung der genomischen Sequenz von <i>cpeA</i>	35
1.2 Charakterisierung des CPEA-Proteins	38
1.3 Reinigung von CPEA	40
1.4 Lokalisierung von CPEA <i>in vivo</i>	41
1.5 Analyse der Expression von <i>cpeA</i>	44
1.5.1 Expression von <i>cpeA</i> in der Entwicklung	44
1.5.2 Expression von <i>cpeA</i> unter Stressbedingungen	46
1.5.3 Expression von <i>cpeA</i> bei Überexpression von <i>edrA</i> und <i>nsdD</i>	47
1.5.4 Expression von <i>cpeA</i> in Abhängigkeit von <i>stuA</i>	51
1.5.5 Deletionsanalyse der STUA-Bindestellen	53
1.6 Nachweis des CPEA-GFP Fusionsproteins <i>in vitro</i>	56
2. Herstellung und Analyse einer subtraktiven cDNA-Bank	58
2.1 Herstellung einer SSH-cDNA-Bank	59
2.2 Verifizierung der Subtraktionseffizienz	59
2.3 Sequenzierung von SSH-Klonen	60
2.4 Northern-Blot Analyse eines SSH-Klones mit Ähnlichkeit zu Mutanasen	63
V. Diskussion	65
VI. Literatur	77
VII. Anhang	83
Lebenslauf	
Dank	

Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin, Fraktion A
CM	Vollmedium („complete medium“)
ΔA_{xy}	Absorptionsänderung bei einer Wellenlänge von xy nm
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid
DEAE	Diethylaminoethyl
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMP	N,N-Dimethyl-p-phenylendiamin
DTT	1,4 Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasenpaare
LB	Luria-Bertani-Medium
MM	Minimalmedium
ORF	Offener Leserahmen („open reading frame“)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PIPES	Piperazin-N, N'-bis (2-Ethan-Sulfonsäure)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute („rounds per minute“)
SDS	Natriumdodecylsulfat („sodiumdodecylsulfat“)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
XGal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galctosid

I. Zusammenfassung

Der filamentöse Ascomycet *Aspergillus nidulans* ist in Böden weit verbreitet und durch die Nutzung eines breiten Substratspektrums an diese Lebensweise angepasst. *A. nidulans* bildet zwei Sorten von Sporen. Die Bildung asexueller Konidiosporen an einem multizellulären Sporenträger, dem Konidiophor, ermöglicht dem Pilz die Besiedlung neuer Substrate, indem diese Sporen durch Wind und Wasser verbreitet werden. Die Entwicklung komplexer Fruchtkörper, der Kleistothezien, wird unter nährstofflimitierten Bedingungen eingeleitet. Die mehrere Tage dauernde Bildung eines Fruchtkörpers wird mit der Reifung meiotischer Ascosporen abgeschlossen, die über lange Zeit unter widrigen Verhältnissen keimungsfähig bleiben. Während seiner Entwicklung ist der Fruchtkörper von globulären Hülle-Zellen umgeben, deren Funktion noch unbekannt ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation des Gens der Phenoloxidase Laccase II, deren Aktivität spezifisch in Hülle-Zellen und jungen Fruchtkörpern von *A. nidulans* nachzuweisen ist, molekular untersucht. Als Voraussetzung für die Ermittlung der genomischen Sequenz war Laccase II zuvor gereinigt worden. Mit Hilfe von Peptidsequenzen, die aus dem Protein erhalten wurden, konnte das korrespondierende Gen identifiziert werden. Die Sequenzanalyse ergab eine große Ähnlichkeit zu Häm-enthaltenden Katalase-Peroxidasen, die in einigen Eubakterien und Archaea beschrieben sind, und das Gen wurde deshalb *cpeA* (*catalase peroxidase A*) genannt. Es stellt die erste experimentell ermittelte Primärsequenz einer eukaryotischen Katalase-Peroxidase dar, eine weitere ist aus dem Genomprojekt des Ascomyceten *Neurospora crassa* bekannt.

Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation von *cpeA* haben gezeigt, daß das Gen während der sexuellen Entwicklung abgelesen wird, in der vegetativen und asexuellen Phase des Lebenszyklus von *A. nidulans* jedoch nicht nachweisbar ist. Eine Induktion von *cpeA* ist aber auch in Hyphen möglich, wenn ein starker Mangel an einer geeigneten Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle herrscht. Durch eine Fusion von CPEA mit dem Grün Fluoreszierenden Protein (GFP) konnte das Enzym im Zytoplasma von Hülle-Zellen und im dikaryotischen Myzel im Inneren der Kleistothezien lokalisiert werden. Es konnte zudem gezeigt werden, daß das Fusionsprotein in den Fruchtkörpern sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* detektierbar ist, während dies in gehungerten Hyphen nicht möglich war, und somit ein Hinweis für eine translationale Kontrolle der Expression von CPEA besteht.

Der Promotorbereich von *cpeA* enthält zwei unmittelbar benachbarte Konsensus-Bindestellen für den entwicklungsabhängigen Transkriptionsregulator STUA. Deletionsanalysen dieser Bindestellen ergaben, daß zumindest eine der beiden funktionell ist, und das Fehlen des Bindemotives eine stark reduzierte Expression von *cpeA* in der Entwicklung, nicht aber in einer Hungerinduktion von Hyphen zur Folge hat. Durch *in vivo* Analyse des unter der Kontrolle eines Promotors ohne STUA-Bindestellen exprimierten CPEA-GFP Fusionsproteins konnte gezeigt werden, daß die Expression in Hülle-Zellen fast vollständig eliminiert war, während das dikaryotische Myzel eine unveränderte Fluoreszenz aufwies. Daraus wurde geschlossen, daß STUA eine zelltypspezifische Aktivierung von *cpeA* in der sexuellen Entwicklung bewirkt.

Um weitere differentiell in der Kleistothezienentwicklung exprimierte Gene zu identifizieren, wurde eine subtraktive cDNA-Bank der sexuellen Entwicklung von *A. nidulans* erzeugt. Die Sequenzanalyse von bislang ca. 80 verschiedenen cDNAs dieser Bank offenbarte eine Akkumulation an Sequenzen, die Homologien zu Proteinen mit einer Funktion in der Adaption an Stressbedingungen haben. Mögliche Zusammenhänge zwischen Stressbedingungen und der Fruchtkörperbildung werden diskutiert.

II. Einleitung

Der filamentöse Eucosmycet *Aspergillus nidulans* ist ein in Böden weit verbreiteter Mikroorganismus. Durch die Fähigkeit eine Vielzahl organischer Substrate verwerten zu können, ist der saprophytisch lebende Organismus in der Lage, sich an veränderliche Nährstoffbedingungen anzupassen. Neben niedermolekularen Substanzen wie Zuckern, Alkoholen und Aminosäuren kann sich *A. nidulans* durch Exkretion von Enzymen auch viele Polymere als Nährstoffquelle erschließen. So können sowohl einfache Polysaccharide und Proteine als auch schwer abbaubare Substanzen wie Lignin, Chitin und Keratin aufgeschlossen werden. Neben einer stark variierenden Verfügbarkeit von Substraten ist der Pilz in seinen Lebensräumen auch anderen ständig wechselnden Umweltbedingungen ausgesetzt. Durch Austrocknung oder Schwankungen in Temperatur und pH-Wert des Bodens können innerhalb kurzer Zeit drastisch veränderte Lebensbedingungen entstehen. Da *A. nidulans* als sessile Lebensform widrigen äußeren Bedingungen nicht entfliehen kann, muß sich der Organismus physiologisch und morphologisch an diese anpassen.

A. nidulans breitet sich durch polares Hyphenwachstum über kurze Distanzen im Boden aus, und kann so neue Substrate besiedeln. Sind die auf diesem Wege erschließbaren Nährstoffressourcen jedoch erschöpft, so können aus den einfach aufgebauten vegetativen Hyphen in kurzer Zeit komplexe Sporenträger, die Konidiophore, gebildet werden. Um diesen Differenzierungsprozeß durchlaufen zu können, muß die vegetative Zelle eine Entwicklungskompetenz erworben haben. Dies setzt ein Alter von mindestens 20 Stunden voraus (Axelrod et al. 1973). Ausgehend von einer solchen Zelle wird ein ca. 70 µm langes vielkerniges Stielchen gebildet, das an seinem Ende zu einem Vesikel anschwillt. Durch Knospung entstehen die einkernigen primären Sterigmata, die sogenannten Metulae, die wiederum durch Knospung eine Lage sekundärer Sterigmata, die Phialiden, hervorbringen. Durch fortlaufende asymmetrische Zellteilungen bilden die Phialiden lange Ketten von asexuellen Konidiosporen. Diese können durch Wind und Wasser verbreitet werden, und ermöglichen es *A. nidulans* neue Lebensräume zu besiedeln (Adams et al. 1998).

Die asexuelle Entwicklung von *A. nidulans* wird seit über 30 Jahren intensiv untersucht. Durch die Analyse von Mutanten, die einen gestörten Ablauf der Konidiophorbildung aufweisen, konnte eine Kaskade von Transkriptionsregulatoren identifiziert werden, die die zu Grunde liegenden morphologischen Veränderungen steuern (Clutterbuck 1969; Clutterbuck

1977; Adams et al. 1998). Eine zentrale Funktion nehmen die Regulatoren *brlA* und *abaA* ein, die im Anschluß an eine Induktion durch äußere Signale nacheinander aktiviert werden. Wichtig für einen korrekten Ablauf der Konidiophorentwicklung ist eine fein abgestimmte räumliche und zeitliche Expression dieser Regulatoren, die durch die modulierende Funktion der Transkriptionsfaktoren *medA* und *stuA* gewährleistet wird (Clutterbuck 1990; Miller et al. 1991; Busby et al. 1996). Voraussetzung für die Induktion der asexuellen Entwicklung ist die Luftexposition der Hyphen. In Flüssigkulturen werden Konidiophore nur unter extremen Hungerbedingungen gebildet (Skromne et al. 1995). Hunger ist jedoch keine Bedingung für die asexuelle Entwicklung an sich, da das Entwicklungsprogramm auch bei einem Nährstoffüberschuß unverändert abläuft (Timberlake 1991). Außerdem muß das vegetative Myzel in einem bestimmten Zeitfenster rotem Licht ausgesetzt sein, um die Konidiophorbildung einleiten zu können (Mooney and Yager 1990). Da dieser Effekt durch Bestrahlung mit langwelligem roten Licht aufgehoben werden kann, wird vermutet, daß das Lichtsignal ähnlich wie in Pflanzen über ein Phytochrom wahrgenommen wird (Timberlake 1991). Eine zentrale, wenn auch auf molekularer Ebene bisher nicht aufgeklärte, Funktion in der Lichtaktivierung hat das *veA* Gen inne. *veA* Mutanten bilden auch in Dunkelheit Konidiosporen, deshalb sind solche Stämme in den Laboren sehr verbreitet.

Wird ein Wildtypstamm in Abwesenheit von Licht inkubiert, so stellt die sexuelle Entwicklung die dominante Form der Sporenbildung dar. Der sexuelle Entwicklungszyklus wird im Anschluß an die Konidiophorentwicklung nach einer Inkubationszeit von ca. 40 Stunden induziert. Zunächst wird ein dichter Rasen sogenannter Hülle-Zellen ausgebildet, dickwandiger globulärer Zellen, die über einen kurzen Stiel mit dem vegetativen Myzel verbunden sind. Trotz der massiven Proliferation dieses Zelltyps in der frühen sexuellen Entwicklung, ist die Funktion der Hülle-Zellen noch immer unbekannt. Es wird vermutet, daß sie die Fruchtkörperbildung eventuell durch die Versorgung mit Nährstoffen unterstützen, experimentelle Belege für diese These stehen jedoch aus. Nach etwa drei Tagen werden Primordien sichtbar, nestartige Gebilde, von denen der Arname *nidulans* „der Nestbildende“ abgeleitet ist. Aus diesen entwickeln sich innerhalb der folgenden 90 Stunden die dunkel gefärbten Kleistothezien, deren Hülle aus einem dreischichtigen, durch das extrazelluläre phenolische Polymer Kleistin zu einer Einheit verbundenen, Hyphen-Netzwerk besteht (Benjamin 1955). Während des gesamten Entwicklungszeitraums wird das entstehende Kleistothezium von einer Schicht Hülle-Zellen umgeben (Zonneveld 1977). Die Reifung der meiotischen Ascosporen findet im Inneren des Kleistotheziums statt. Ausgangspunkt ist

vermutlich eine einzige dikaryotische Zelle, die aus einer mehrkernigen vegetativen Hyphe hervorgeht. Im Folgenden entsteht aus dieser Zelle ein reich verzweigtes dikaryotisches Myzel (Ward 1991), das durch die Fusion zweier haploider Kerne in terminalen Zellen die Entwicklung der Asci einleitet. Eine meiotische und eine mitotische Kernteilung führen zur Bildung von acht haploiden einkernigen Ascosporen, die anschließend eine weitere Mitose ohne Zellteilung durchlaufen. Die rot pigmentierten Ascosporen können über Jahre im Boden überdauern (Timberlake 1990; Champe and Simon 1992). So ist es *A. nidulans* möglich, lange Perioden widriger äußerer Bedingungen zu überstehen, um dann unter günstigen Bedingungen erneut auszukeimen.

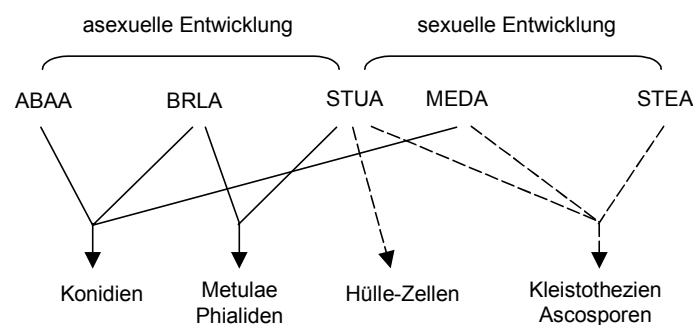


Abb. 1: Schema morphogenetischer Regulatoren der Entwicklungszyklen von *A. nidulans*. Durchgezogene Linien symbolisieren Regulationen der asexuellen Entwicklung, gestrichelte Linien Regulationen der sexuellen Entwicklung (verändert nach Vallim *et al.*, 2000).

Als homothallischer Vertreter der Ascomyceten ist *A. nidulans* selbstfertil und jede einzelne Kolonie ist in der Lage, den vollständigen sexuellen Entwicklungszyklus zu durchlaufen, ohne zuvor ein Heterokaryon mit einem adäquaten Kreuzungspartner auszubilden (Pontecorvo *et al.* 1953). Trotz der fehlenden Notwendigkeit, mit einem Partner zu kommunizieren, haben pheromonähnliche Substanzen eine wichtige Funktion in der Induktion der Fruchtkörperbildung. Es konnten drei hydroxylierte C₁₈-Fettsäuren, Psi A, B und C identifiziert werden, die auf antagonistische Weise in die Steuerung des asexuellen und sexuellen Entwicklungszyklus eingreifen. Während Psi B und C eine frühzeitige und dichte Kleistothozienbildung stimulieren, hat Psi A einen gegenteiligen Effekt. Da das zyklische Psi A *in vitro* durch eine Ringspaltung in Psi C umgesetzt werden kann, wird vermutet, daß diese Umsetzung *in vivo* durch eine bisher nicht identifizierte Laktonase katalysiert wird und einen Mechanismus zur Regulation der Fruchtkörperentwicklung darstellt (Champe *et al.* 1987; Champe and El-Zayat 1989; Mazur *et al.* 1990).

Umweltbedingungen spielen eine entscheidende Rolle in der Induktion der Fruchtkörperbildung. Besteht ein Mangel an Glukose, Nitrat oder Phosphat, so wird die Kleistothezienentwicklung in der Kolonie eingeleitet (Zonneveld 1977). Der Energiehaushalt der Zelle ist hierbei von besonderer Wichtigkeit. Da die Bildung einer großen Anzahl komplexer Fruchtkörper sehr viel Energie und Baustoffe für Biosyntheseleistungen verlangt, müssen entsprechende Reserven angelegt sein. Eine essentielle Funktion als Energie- und Kohlehydratspeicher für die sexuelle Entwicklung in *A. nidulans* hat das Polysaccharid α -1,3-Glukan. Dieses wird während der vegetativen Wachstumsphase in die Hyphenzellwand eingelagert und kann in drei Tage alten Kolonien mehr als ein Drittel der Trockenzellmasse darstellen (Zonneveld 1974). Die Synthese des Reservestoffes zeigt dabei eine starke Abhängigkeit von der Glukosekonzentration im Medium und bei unzureichender Energieversorgung der Hyphen wird nur sehr wenig α -1,3-Glukan gebildet (Zonneveld 1972a). Die Fähigkeit, Kleistothezien zu entwickeln, steht in unmittelbarem Zusammenhang mit der Verfügbarkeit des Reservestoffes. Mit zunehmender Einlagerung steigt die Kleistothezien-dichte, wird hingegen kein α -1,3-Glukan synthetisiert, unterbleibt auch die Fruchtkörperbildung. Um die Kohlehydratreserve zu mobilisieren, exprimiert *A. nidulans* nach Verbrauch der externen Kohlenstoffressourcen eine α -1,3-Glukanase, die in die Zellwand exkretiert wird und das α -1,3-Glukan spaltet, so daß die freigesetzte Glukose für die Zelle verfügbar wird (Zonneveld 1972b).

Die Wichtigkeit einer guten Versorgung mit Energie und Baustoffen für die Fruchtkörperbildung zeigt sich auch darin, daß sich Mutationen in Genen zentraler Stoffwechselwege häufig besonders stark auf die sexuelle Entwicklung auswirken (Käfer 1977). Dieser Zusammenhang konnte auch in anderen fruchtkörperbildenden Ascomyceten gefunden werden. So hat eine Mutation im Komplex I der Atmungskette von *Neurospora crassa* den frühen Abbruch der sexuellen Entwicklung zur Folge, während das vegetative Wachstum der Mutante kaum beeinträchtigt ist (Duarte and Videira 2000). In *Sordaria macrospora* verhindert die Mutation einer zytoplasmatischen ATP Citrat Lyase die Bildung reifer Ascosporen (Nowrousian et al. 1999). Auch Peroxisomen scheinen speziell in der Fruchtkörperbildung eine essentielle Funktion zu besitzen, da sich deren Anzahl während der Ascosporenentwicklung von *Podospora anserina* drastisch erhöht, und eine Mutation in dem peroxisomalen Protein CAR1 von *P. anserina*, einem Homolog des Säugetierproteins PAF1 (Zellweger Syndrom), einen Karyogamiedefekt hervorruft (Berteaux-Lecellier et al. 1995).

Seit langem ist bekannt, daß *A. nidulans* Stämme mit Aminosäure-Auxotrophien die Kleistothezienentwicklung nicht beenden, auch wenn sie auf Medien kultiviert werden, die mit der entsprechenden Aminosäure supplementiert sind (Käfer 1977). Der Entwicklungsstopp erfolgt dabei zu einem definierten Zeitpunkt vor der Meiose und läßt sich durch eine erhöhte Konzentration der Aminosäure überwinden (Eckert et al. 1999; Busch et al. 2001). Besteht ein Mangel an einer einzelnen Aminosäure, z. B. Histidin oder Tryptophan, so wird in Ascomyceten ein transkriptionelles Netzwerk von Genen verschiedener Aminosäure-Biosynthesewege aktiviert, das als „cross pathway control“ bezeichnet wird. Dieses Netzwerk wird in *A. nidulans* unter Mangelbedingungen durch den Transkriptionsfaktor CPCA aktiviert und bei ausreichender Versorgung mit Aminosäuren durch CPCB reprimiert. Es konnte schließlich gezeigt werden, daß ein regulatorischer Zusammenhang zwischen der Kleistothezienbildung und dem „cross pathway control“ Netzwerk existiert, da die Überexpression von CPCA, unabhängig von der Aminosäureversorgung, sowohl die Aktivierung der Aminosäure-Biosynthesewege als auch den Abbruch der sexuellen Entwicklung zur Folge hat (Hoffmann et al. 2000). Dies macht deutlich, daß sich Beeinträchtigungen in metabolischen Funktionen nicht nur über die verringerte Bereitstellung essentieller Baustoffe auf die Fruchtkörperentwicklung auswirken, sondern daß zudem eine regulatorische Quervernetzung besteht.

Die Steuerung der sexuellen Entwicklung ist noch wenig verstanden, es konnten aber durch molekulare Analysen bisher zwei spezifische Transkriptionsregulatoren identifiziert werden. Eine koreanische Gruppe war mit dem Versuch, wichtige Gene der Entwicklung durch die Komplementation von Mutanten zu isolieren, die nicht in der Lage sind Kleistothezien zu bilden, erfolgreich. Sie identifizierten auf diese Weise den GATA-Transkriptionsfaktor *nsdD*, der eine wichtige Funktion in der frühen Phase der Kleistothezienentwicklung ausübt. Werden mehrere Kopien des Gens in *A. nidulans* exprimiert, so verschiebt sich die Balance zwischen asexuellem und sexuellem Zyklus und es werden deutlich mehr Fruchtkörper gebildet (Chae et al. 1995). In einer anderen Arbeit wurde das *A. nidulans* Homolog STEA des Zink-Finger Transkriptionsfaktors STE12, eines Regulators der Morphogenese in *Saccharomyces cerevisiae*, untersucht. Es zeigte sich, daß STEA an der Steuerung der Fruchtkörperbildung beteiligt ist. Eine *steA* Deletionsmutante entwickelt keine Kleistothezien, während die Differenzierung von Konidiophoren und Hülle-Zellen nicht beeinträchtigt ist (Vallim et al. 2000). Zudem weiß man, daß zentrale Regulatoren der Konidiophorentwicklung auch an der Steuerung der sexuellen Entwicklung beteiligt sind. *stuA* und *medA* Mutanten

weisen neben morphologisch veränderten Konidiophoren ausgeprägte Störungen der Fruchtkörperbildung auf. Die *medA* Mutante bildet zwar eine hohe Anzahl von Hülle-Zellen, jedoch keine Kleistothezien und Ascosporen. In der *stuA* Mutante fehlen sowohl Hülle-Zellen als auch Kleistothezien und Ascosporen (Wu and Miller 1997). Die Funktion beider Gene in der sexuellen Entwicklung ist nicht aufgeklärt und es sind keine Zielgene der Regulatoren im Entwicklungsprogramm der Kleistothezien bekannt.

Die komplexen Wechselwirkungen zwischen Umweltsignalen und eigenen Botenstoffen mit dem regulatorischen Netzwerk der Fruchtkörperentwicklung, und die hohen enzymatischen Anforderungen der Zelldifferenzierungsprozesse, die sich in den bisherigen Untersuchungen angedeutet haben, lassen vermuten, daß eine Vielzahl noch unbekannter Komponenten existiert. Die Identifizierung dieser Komponenten kann zu einem besseren Verständnis eukaryotischer Entwicklungsprozesse beitragen. Aufgrund der großen Bandbreite verfügbarer biochemischer, genetischer und molekularbiologischer Methoden zur Bearbeitung der sich ergebenden Fragestellungen eignet sich *A. nidulans* gut für solche Analysen.

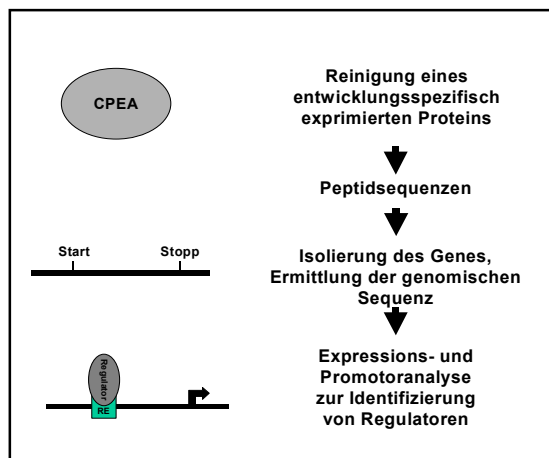


Abb. 2: Strategie zur Identifizierung eines transkriptionellen Regulators der sexuellen Entwicklung von *A. nidulans*. Durch die Reinigung der Katalase-Peroxidase CPEA, deren Aktivität spezifisch in der Fruchtkörperbildung detektiert werden konnte, und der Sequenzierung interner Peptide dieses Proteins, sollten die Voraussetzungen geschaffen werden, ein Fragment des korrespondierenden Gens mit Hilfe von aus den Peptidsequenzen abgeleiteten degenerierten Oligonukleotiden in einer PCR-Reaktion amplifizieren zu können. Dieses Fragment sollte anschließend zur Ermittlung des vollständigen *cpeA*-Gens genutzt werden. Durch eine Analyse der Expression von *cpeA* und der Identifizierung von Promotorelementen, die für eine entwicklungsabhängige Transkription von *cpeA* notwendig sind, sollte dann als langfristiges Projektziel ein Regulator der Kleistothezienentwicklung gefunden werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation einer differentiell in der Fruchtkörperentwicklung von *A. nidulans* exprimierten Katalase-Peroxidase molekular untersucht, um als langfristiges Ziel des Projektes einen Regulator der sexuellen Entwicklung zu identifizieren. Das Enzym wurde ursprünglich als spezifisch in Hülle-Zellen und Primordien aktive Phenoloxidase, Laccase II, beschrieben (Hermann et al. 1983). Als Voraussetzung für die Identifizierung des für Laccase II kodierenden Gens wurde dieses Enzym gereinigt und interne Peptide zur Ableitung degenerierter Oligonukleotide erzeugt

(Scherer and Fischer 1998). Die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse des Gens zeigte jedoch, daß es sich um eine Katalase-Peroxidase handelt. Das Gen wurde deshalb *cpeA* (*catalase-peroxidase A*) genannt. Die molekulare Analyse von *cpeA* sollte zu einem besseren Verständnis der Regulation der Kleistothezienentwicklung beitragen und Hinweise darauf geben, wie Umwelteinflüsse in diesem Prozeß in eine zelluläre Antwort umgesetzt werden.

III. Material und Methoden

1. Chemikalien und Materialien

Chemikalien und Biochemikalien wurden, wenn nicht gesondert darauf hingewiesen, von den Firmen Boehringer (Mannheim), E. Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen), Roth (Karlsruhe), BIOMOL (Hamburg) und Difco Laboratories (Detroit, MI, USA) verwendet. Restriktionsenzyme und andere DNA-modifizierende Enzyme waren von Amersham (Braunschweig). Die Radionukleotide [α - 32 P]-dATP, und [α - 32 P]-dCTP wurden von Hartmann Analytics (Braunschweig) bezogen. Die Autoradiographiefilme waren von Kodak (X-OMAT™ AR, Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA) oder Fuji (New RX, Fuji, Japan.). Die Filtermembran (Miracloth) wurde von Calbiochem-Novabiochem (Bad Soden/Ts.) bezogen. Die FPLC-Fertigsäulen Phenylsepharose, Mono Q und SP-Sephacel, sowie das Proteintrennmedium DEAE-Sepharose sind Produkte der Firma Pharmacia LKB (Freiburg).

2. Verwendete Organismen und mikrobiologische Methoden

2.1 Organismen

In dieser Arbeit wurde mit den folgenden *Aspergillus nidulans*- und *Escherichia coli*-Stämmen gearbeitet.

Tabelle 1: Genotypen und Herkunft der verwendeten *Aspergillus nidulans* und *Escherichia coli* Stämme..

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Aspergillus nidulans</i>		
FGSCA4	Wildtyp	Fungal Genetics Stock Center, Kansas, USA
RMSO11	<i>pabaA1, yA2, ΔargB::trpCΔB; veA1, trpC801</i>	(Stringer et al. 1991)
SRF200	<i>pyrG89; ΔargB::trpCΔB; pyroA4; veA1</i>	R. Fischer, Marburg
GR5	<i>pyrG89; wa3; pyroA4; veA1</i>	G. May, Houston, TX, USA
WIM126	<i>yA2, pabaA1</i>	S. Champe
GO256	<i>biA1::stuA1; veA1</i>	J. Clutterbuck
AJC48	<i>biA1; medA26</i>	J. Clutterbuck
DVAR1	<i>yA2, pabaA1; ΔargB::trpCΔB; trpC801, ΔveA::argB</i>	K.-S. Chae, Chonju, Korea
OVAR5	<i>yA2, pabaA1; ΔargB::trpCΔB; trpC801, veA1, niiA(p)::veA</i>	K.-S. Chae, Chonju, Korea
TTA292	<i>biA1; alcA(p)::brlA; methG1; veA1</i>	(Adams et al. 1988)
TPM1	<i>biA1; alcA(p)::abaA; methG1; veA1</i>	(Mirabito et al. 1989)
UI132	<i>yA2; wa3; alcA(p)::stuA; ivoA1; sc12; methH2; galA1</i>	B. Miller, Moscow, ID, USA

Stamm	Genotyp	Referenz
SMS1	<i>yA2; dcl; veA1</i>	(Scherer and Fischer 1998)
SMS7	<i>pyrG89; pyroA4; veA1</i>	Kreuzung aus SRF200 und WIM126; diese Arbeit
SMS8	<i>yA2, pabaA1; ΔargB::trpCΔB; pyroA4</i>	Kreuzung aus SRF200 und WIM126; diese Arbeit
SMS11	<i>yA2, pabaA1; ΔargB::trpCΔB; pyroA4; argB::cpeA::sGFP</i>	SMS8 transformiert mit pMS42; diese Arbeit
SMS12	<i>yA2, pabaA1; ΔargB::trpCΔB; pyroA4; argB::cpeA::sGFP</i>	SMS8 transformiert mit pMS40; diese Arbeit
SMS13	<i>yA2, pabaA1; ΔargB::trpCΔB; pyroA4; argB::cpeA::sGFP</i>	SMS8 transformiert mit pMS40; diese Arbeit
SMS14	<i>yA2, pabaA1; ΔargB::trpCΔB; pyroA4; argB::cpeA::sGFP</i>	SMS8 transformiert mit pMS41; diese Arbeit
SMS15	<i>yA2, pabaA1; ΔargB::trpCΔB; pyroA4; argB::cpeA::sGFP</i>	SMS8 transformiert mit pMS41; diese Arbeit
SMS16	<i>yA2, pabaA1; ΔargB::trpCΔB; pyroA4; argB::cpeA::sGFP</i>	SMS8 transformiert mit pMS42; diese Arbeit
SMS17	<i>yA2, pabaA1; ΔargB::trpCΔB; pyroA4; argB::cpeA::sGFP</i>	SMS8 transformiert mit pMS42; diese Arbeit
SMS19	<i>yA2, pabaA1; ΔargB::trpCΔB; pyroA4; argB::cpeA::sGFP</i>	SMS8 transformiert mit pMS42; diese Arbeit
SMS24	<i>pabaA1, yA2, ΔargB::trpCΔB; veA1, trpC801; gpdA(p)::edrA::argB</i>	RMSO11 transformiert mit pMS51; diese Arbeit
SMS25	<i>pyrG89; ΔargB::trpCΔB; pyroA4; gpdA(p)::nsdD::pyr4</i>	SRF200 transformiert mit pMS19; diese Arbeit
SMS26	<i>pyrG89; ΔargB::trpCΔB; pyroA4; gpdA(p)::nsdD::pyr4</i>	SRF200 transformiert mit pMS19; diese Arbeit
SMS27	<i>pyrG89; ΔargB::trpCΔB; pyroA4; gpdA(p)::nsdD::pyr4</i>	SRF200 transformiert mit pMS19; diese Arbeit
SMS29	<i>yA2, pabaA1; ΔargB::trpCΔB; pyroA4</i>	SMS8 transformiert mit pDC1; diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i>		
XL1-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F'proABlacI^QZΔM15::Tn10 (Tet^R)]</i>	Stratagene, Heidelberg
Top10F'	<i>F'[lacI^R, Tn10 (Tet^R)] mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), Φ80 lacZ ΔM15ΔlacX74, deoR, recA1, araD139Δ(ara-leu)7679, galU, galK, rpsL, (Str^R) endA1, nupG</i>	Invitrogen, Leek, Niederlande
GM2159	<i>thr-1, araC14, leuB6, DE(gpt-proA)62, lacY1, tsx-33, glnV44(AS), galK2(Oc), LAM-, hisG4(Oc), rpsL31(strR), dam-13::Tn9, xylA5, mtl-1, recF143, argE3(Oc), thi-1</i>	<i>E. coli</i> Genetic Stock Center, New Haven, CT, USA

2.2 Züchtung der Organismen

Die *E. coli* Medien wurden wie bei (Sambrook et al. 1989) beschrieben hergestellt (Tabelle 2) und je nach Versuchsansatz mit Antibiotika und Nachweisreagenzien supplementiert (Tabelle 3).

Die *A. nidulans* Medien wurden wie bei (Pontecorvo et al. 1953) beschrieben hergestellt. *A. nidulans* Voll- und Minimalmedien wurden je nach Stamm und Versuch mit Vitaminen, Aminosäuren, Nukleotiden bzw. für Transformationsexperimente mit osmoprotektiven Substanzen (Tabelle 4 und 5) komplementiert. Für Festmedien wurden zusätzlich 15 g Agar pro Liter eingewogen.

Tabelle 2: Medien für *E. coli*

Medien	Zusammensetzung (je l)
LB	10 g Trypton; 10 g Hefeextrakt; 5 g NaCl
SOC	20 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 0,58 g NaCl; 0,185 g KCl; 2,03 g MgCl ₂ x 7H ₂ O; 2,46 g MgSO ₄ x 7H ₂ O; 3,6 g Glukose

Tabelle 3: Antibiotika und Nachweisreagenzien für *E. coli* Medien

Substanz	Endkonzentration
Ampicillin	100 µg/ml
Tetracyclin	25 µg/ml
XGal	40 µg/ml
IPTG	8 µg/ml

Tabelle 4: Medien und Zusätze für *A. nidulans*

Medien	Zusammensetzung (je l)
Vollmedium (CM)	50 ml Salz-Stammlösung; 20 g Glukose; 2 g Pepton; 1 g Hefeextrakt; 1 g Casaminosäuren; 1 ml Vitaminlösung; 1 ml Spurenelementelösung; mit 10 N Natriumhydroxid auf pH ~6,5 eingestellt
Minimalmedium (MM)	50 ml Salz-Stammlösung; 1 ml Spurenelementelösung; 10 g Glukose; mit 10 N Natriumhydroxid auf pH ~6,5 eingestellt; zur Regeneration von Protoplasten mit 0,6 M KCl supplementiert
Salz-Stammlösung (20-fach)	120 g NaNO ₃ ; 10,4 g KCl; 10,4 g MgSO ₄ x 7H ₂ O; 30,4 g KH ₂ PO ₄
Spurenelementelösung (1000-fach)	22 g ZnSO ₄ x 7H ₂ O; 11 g H ₃ BO ₃ ; 5 g MnCl ₂ x 4H ₂ O; 5 g FeSO ₄ x 7H ₂ O; 1,6 g CoCl ₂ x 5H ₂ O; 1,6 g CuSO ₄ x 5H ₂ O; 1,1 g (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4H ₂ O; 50 g Na ₄ EDTA; mit Kaliumhydroxidplätzchen auf pH 6,5-6,8 eingestellt

Tabelle 5: Vitamine, Aminosäuren und andere Medienkomponenten

Substanz	Konzentration der Stammlösung	eingesetzte Menge (je l)
Biotin	0,05 %	1 ml
Nicotinamid	0,5 %	1 ml
Pyridoxin-hydrochlorid	0,1 %	1 ml
p-Aminobenzoessäure	0,1 %	1 ml
Riboflavin	0,25 %	1 ml
Arginin	500 mM	10 ml
Uracil	-	1 g
Uridin	500 mM	10 g
Methionin	1 %	3 ml

A. nidulans- und *E. coli*- Kulturen wurden, soweit nicht anders angegeben, aerob bei 37°C inkubiert. Flüssigkulturen wurden in Erlenmeyerkolben auf Schütteltischen (200-300 rpm) gezüchtet.

Medien und Lösungen wurden 20 min bei 121°C und 1 bar Überdruck, Glaswaren und Keramiknutschen im Heizschrank 3 Stunden bei 180°C sterilisiert.

Hitzeempfindliche Lösungen wie Antibiotika, Aminosäuren und Vitamine wurden sterilfiltriert (Sterilfilter mit 0,2 µm Porengröße; Schleicher und Schüll, Dassel).

Die Zelldichte von Bakterienkulturen wurde photometrisch durch Absorptionsmessung bei 578 nm (ΔA_{578}) an einem Pharmacia Photometer (Pharmacia LKB - UltrospecIII) bestimmt.

3. Genetische Methoden in *A. nidulans*

Genetische Untersuchungen bei *A. nidulans* wurden im wesentlichen nach den Protokollen von Pontecorno (1953), Morris (1976), Käfer (1977) und Clutterbuck (1969; 1994) durchgeführt. In Tabelle 6 sind alle Gene aufgeführt, die in den verwendeten Stämmen mutiert sind und im Text nicht näher erklärt werden.

Tabelle 6: Liste der *A. nidulans* Marker

Marker	Nachweis/Funktion	Chromosom
<i>argB</i>	Arginin-Auxotrophie/ OTCase	III
<i>biA1</i>	Biotin-Auxotrophie	I
<i>galA1</i>	Galaktose-Verwertung	III
<i>ivoA1</i>	Konidiophore ohne Melanin	III
<i>methG1</i>	Methionin-Auxotrophie/ Cystathionin-Lyase	IV
<i>methH2</i>	Methionin-Auxotrophie/ THPTG Methyltransferase	III
<i>pabaA1</i>	<i>p</i> -Aminobenzoesäure-Auxotrophie	I
<i>pyrG89</i>	Uracil-Auxotrophie/ Orotidin-MP- Decarboxylase	I
<i>pyroA4</i>	Pyridoxin-Auxotrophie	IV
<i>trpC801</i>	Tryptophan-Auxotrophie/ Phosphoribosylanthranilat-Isomerase	VII
<i>veA1</i>	Konidienbildung lichtunabhängig	VIII
<i>wA3</i>	weiße Konidiosporen/ Polyketidsynthase	II
<i>yA2</i>	gelbe Konidiosporen/ Laccase I	I

3.1 Kreuzungen von *A. nidulans* und Genotypen-Test

Die zu kreuzenden Stämme wurden auf Vollmedium (CM)-Platten nebeneinander angeimpft und zwei Tage inkubiert, bis die Myzelien zusammengewachsen waren. Aus der Schnittstelle beider Kolonien wurde ein kleiner Agarblock ausgeschnitten und auf Minimalmedium(MM)-Platten, die nur ein Wachstum des Heterokaryons erlaubten, überführt. Die Platten wurden mit Klebeband verschlossen und für 10-14 Tage bei 37°C inkubiert. Die nach diesem Zeitraum gebildeten Fruchtkörper (Kleistothezien) wurden mit Hilfe einer sterilen Impfnadel isoliert, auf einer Agarplatte unter dem Binokular durch vorsichtiges Rollen von den Hülle-Zellen befreit und in 0,5 ml H₂O in einem Eppendorf-Cup zerdrückt. Ein Aliquot der Ascosporensuspension wurde auf CM-Platten ausplattiert. Nach 2-3 Tagen Inkubation konnte die Kreuzung ausgewertet werden. Für die Genotypenbestimmung eines *A. nidulans*-Stammes wurde dieser auf MM-Platten transferiert, auf denen jeweils einer der zu testenden Auxotrophiemarker fehlte. Sollten mehrere Stämme untersucht werden, so wurden diese auf Rasterplatten (20 Kolonien/Platte) angeimpft (Sievers et al. 1997).

4. Molekularbiologische Methoden

4.1 Plasmide und Cosmide

In dieser Arbeit wurde mit folgenden Plasmiden und Cosmiden gearbeitet.

Tabelle 7: Plasmide und Cosmide

Plasmid/ Cosmid	Beschreibung	Referenz
pBluescript KS ⁻	Klonierungs- und Expressionsvektor mit hoher Kopienzahl, Amp ^R	Stratagene, Heidelberg
pUC18	Klonierungsvektor mit hoher Kopienzahl	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
pCR2.1	Klonierungsvektor mit 3‘T-Überhang zur Klonierung von PCR-Produkten; hohe Kopienzahl	Invitrogen, Leek, Niederlande
pCR II	Klonierungsvektor mit 3‘T-Überhang zur Klonierung von PCR-Produkten; hohe Kopienzahl	Invitrogen, Leek, Niederlande
pRG1	<i>pyr4</i> -Gen beinhaltendes Plasmid, <i>pyr4</i> aus <i>Neurospora crassa</i>	(Waring et al. 1989)
TOPO30	1,9 kb <i>pyr4</i> mit <i>NotI</i> -Schnittstellen in pCR II	diese Arbeit
pDC1	<i>argB</i> -Gen aus <i>A. nidulans</i> im Vektor pIC20R	(Aramayo et al. 1989)
pNic3	sGFP mit <i>NotI</i> -Schnittstellen in Vektor pCR II	N. Sievers, Marburg
pRS72.3	0,9 kb Fragment des <i>gpdA</i> -Promotors mit <i>BamHI</i> -Schnittstellen in pCR II	R. Suelmann, Marburg
pRS85	1,8 kb <i>argB</i> mit <i>NotI</i> -Schnittstellen in pCR II	R. Suelmann, Marburg
pMS16	<i>cpeA</i> genomische DNA <i>PstI</i> (3 kb) in KS ⁻ ; <i>argB</i> aus pRS85 in <i>NotI</i> -Schnittstelle	diese Arbeit
pMS18	sGFP (0,7 kb) mit <i>ClaI</i> -Schnittstellen (Primer <i>gfpCla1-gfpCla2</i>) in „frame“ in <i>ClaI</i> -Schnittstelle in <i>cpeA</i> -ORF von pMS16; <i>ClaI</i> -Schnittstelle in KS ⁻ -Polylinker entfernt	diese Arbeit
pMS19	<i>nsdD</i> genomische DNA (1,7 kb, Primer <i>nsdEcoR5.1-nsdEcoR5.2</i>) in <i>EcoRV</i> von pRS72.3; <i>pyr4</i> in <i>NotI</i>	diese Arbeit
pMS37	1,65 kb von <i>cpeA</i> -Promotorbereich (<i>perKOtest-procom3</i>) in pCR II	diese Arbeit
pMS38	1,05 kb von <i>cpeA</i> -Promotorbereich (<i>perKOtest2-procom3</i>) in pCR II	diese Arbeit
pMS39	1,0 kb von <i>cpeA</i> -Promotorbereich (<i>per5’-procom3</i>) in pCR II	diese Arbeit
pMS40	0,1 kb <i>SmaI</i> -Fragment aus pMS18 ersetzt durch 1,4 kb <i>EcoRV/SmaI</i> -Fragment aus pMS37; Verlängerung des <i>cpeA</i> -Promotors	diese Arbeit
pMS41	0,1 kb <i>SmaI</i> -Fragment aus pMS18 ersetzt durch 0,8 kb <i>EcoRV/SmaI</i> -Fragment aus pMS38; Verlängerung des <i>cpeA</i> -Promotors	diese Arbeit
pMS42	0,1 kb <i>SmaI</i> -Fragment aus pMS18 ersetzt durch 0,8 kb <i>EcoRV/SmaI</i> -Fragment aus pMS39;	diese Arbeit

Plasmid/ Cosmid	Beschreibung	Referenz
pBluescript KS ⁻	Klonierungs- und Expressionsvektor mit hoher Kopienzahl, Amp ^R Verlängerung des <i>cpeA</i> -Promotors	Stratagene, Heidelberg
pMS46	<i>cpeA</i> genomische DNA, 5,5 kb <i>EcoRV</i> aus pMS49	diese Arbeit
pMS47	<i>cpeA</i> genomische DNA, 2,6 kb <i>BamHI</i> aus pMS49	diese Arbeit
pMS49	Cosmid aus <i>A. nidulans</i> Genbank pKBY mit vollständigem <i>cpeA</i> -Gen	FGSC, Kansas, USA
pMS50	1,1 kb cDNA <i>cpeA</i> 5'-Bereich in pCR II	diese Arbeit
pMS51	<i>edrA</i> genomische DNA 2,3 kb (Primer pro1/5'-pro1/3') in <i>XhoI</i> von KS ⁻ ; 0,9 kb <i>gpdA</i> -Promotor aus pRS 73.2 in <i>BamHI</i> ; <i>argB</i> aus pRS85 in <i>NotI</i>	diese Arbeit

4.2 Präparation und Restriktion von DNA

Plasmid-DNA-Präparation

Plasmid-DNA wurde in kleinen Ansätzen (2 ml Kulturen) wie bei Sambrook *et al.* (1989) beschrieben oder durch das QIAprep Spin Miniprep System (Qiagen, Hilden) isoliert. Die Präparation erfolgte nach Vorschrift des Herstellers. Plasmid-DNA-Präparationen in größeren Ansätzen (Midiprep, bzw. Maxiprep) erfolgten durch alkalische Lyse nach der Methode von Sambrook *et al.* (1989). Eine weitere Aufreinigung erfolgte durch Phenol/Chloroform-Extraktion. Alternativ wurde für die Aufbereitung und Reinigung großer Ansätze Nucleobond AX100, bzw. AX500 der Firma Macherey-Nagel (Düren) verwendet. Die Bestimmung der Plasmid-DNA Konzentration erfolgte durch Absorptionsmessungen bei 260 und 280 nm in einem Photometer (Pharmacia LKB - UltrospecIII) in Quarzküvetten. Ein ΔA_{260} von 1 entspricht einer DNA-Konzentration von 50 μg pro ml (Sambrook *et al.*, 1989).

Isolierung von genomischer DNA aus *A. nidulans*

Die Isolierung genomischer DNA aus *A. nidulans* wurde durchgeführt, indem *Aspergillus*-Myzel gefriergetrocknet, zermörsert und mit Extraktionspuffer aufgeschlossen wurde (Timberlake and Marshall 1989). Die DNA-Gewinnung und Reinigung aus *Aspergillus*-Myzel erfolgte mittels des Dneasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden). Zur Myzelgewinnung aus sporenbildenden Stämmen wurden 20 ml MM in einer Petrischale mit Sporen beimpft und für 12 -15 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Myzel vom Medium mit einem Spatel abgehoben und kurz zwischen Papierhandtüchern trockengepresst. Zur Gewinnung von Myzel

von sporenlosen Stämmen wurde von mehreren (2 -5) dicht bewachsenen Agarplatten Myzel mit einer sterilen Impföse abgekratzt und in einen Erlenmeyerkolben mit 50 ml MM überführt. Nach Inkubation auf einem Schüttler bei 200 rpm und 37°C für 12 -15 h wurde das Myzel durch eine Membran (Miracloth) filtriert, gewaschen und anschließend mit einem Spatel vom Filter abgehoben. Zur Kontrolle der Qualität und der Ausbeute der genomischen DNA wurden jeweils 5 µl auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt.

Restriktion von DNA

Sofern nicht anders vermerkt, wurden Ansätze mit 20 µl Gesamtvolumen angesetzt, die 0,5 - 1 µl Restriktionsenzym (1 –20 U/µl) enthielten. Die Inkubation erfolgte in den entsprechenden Reaktionspuffern nach Angaben des Herstellers für eine Stunde. Anschließend erfolgte die Inaktivierung des Enzyms durch Erhitzen gemäß den Herstellerangaben.

4.3 Gelelektrophorese von DNA

Die Trennung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe von 1 –2 %igen Agarosegelen (Sambrook *et al.*, 1989) in TAE-Puffer (40 mM Tris/Acetat pH 8,0; 1 mM EDTA). Als Größenstandard diente λ-DNA, die mit *Eco130I* geschnitten worden war (MBI Fermentas, St.Leon-Rot). Die Gele wurden 15 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/µl) gefärbt und unter UV-Licht bei 302 nm sichtbar gemacht und durch eine Kamera (INTAS, Göttingen) und einen Videoprinter dokumentiert.

4.4 PCR

Polymerase Chain Reaction (PCR) wurde mit Taq-Polymerase (Gibco), Expand (Boehringer), oder Pfu (Promega) nach Angaben der Hersteller durchgeführt. Die Synthese von Oligonukleotiden wurde bei MWG Biotech (Ebersberg) in Auftrag gegeben und mit einer Konzentration von 5 –20 pmol pro Ansatz (10 –100 µl) verwendet. Die als Matritze eingesetzte DNA Menge pro Ansatz betrug 0,2 –20 ng genomische DNA bzw. 10 ng Plasmid-DNA. Die PCR Reaktionen erfolgten mit einem Personal Cycler (Biometra), oder einem Rapid Cycler (Idaho Technology, Idaho Falls, ID, USA). Die PCR Programme wurden je nach Anwendung in Polymerisationsdauer und Annealingtemperatur variiert. Es wurden 25 – 40 Zyklen durchlaufen, die Denaturierungstemperatur betrug jeweils 95°C, die Polymerisationstemperatur 68 -72°C. Zum Anfügen von Restriktionsschnittstellen an PCR-

Fragmente wurden zunächst 2-4 Zyklen mit einer Annealingtemperatur 5 -10°C unter der Schmelztemperatur der Oligonukleotide durchgeführt.

Tabelle 8: Verwendete Oligonukleotide; 5'→3' Richtung

Bezeichnung	Sequenz
gfpCla1	GGATCGATTGATGGTGAGCAAGGG
gfpCla2	GGATCGATGCTTTGTACAGCTCG
per1	CACACATGGGTCTTATTTACG
per2	GTGACAGGTCAGTTGTCAGC
perc1	AATCAAGCAGTTGAAGACAC
procom3	GCTTGATTCGATAAAGGATTGATAGG
per5'	CAGATGTCTAGAGCCACTGC
perKOtest	TACTCTCAGATAGAGGTGGC
perKOtest2	GTGTGTTTCGGCATGACGC
pro1	GCTCGCTTCATTGGCGG
nsdEcoR5.1	CCGATATCCTGCGCTATGGGATCAC
nsdEcoR5.2	CCGATATCAACAATAGAGCTTCACAATC
pro1/5'	TACCTCGAGCACCTGTCGCAGATATCTGG
pro1/3'	GCCCTCGAGAAATATTAAGCAGAAGATAGTGCC
pro1int1	CCCAGCTCGACCATGCCG
pro2int1	GCCAAGCCCTGGGAGACG
pro2int2	GGTTGCTGAAAAGGACTCTCC
alcA1	CGCTATGATGGGTCCTGGCC
alcA2	TGTACATACCTCTGTTCCAAGCG
aba1	CGGCAGACTTGCAGCTACCT
aba2	GTTCTGTAGACGTCGCAAGC
stu1	CAGAGGAACATGACAGTGCC
stu2	CGGTCTTTGCAACGGTGCC
brl4	GCTTGATGACCTGTGGTAGG
brl5	GTTCTGCTTCGATGCGCAG

4.5 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Sollten DNA-Fragmente aus Gelen isoliert werden, wurden 0,8 %ige "low melting" Agarosegele verwendet. Die durch Gelelektrophorese in einem TAE-Agarosegel getrennten DNA-Fragmente wurden in Ethidiumbromidlösung gefärbt. Die entsprechende Bande wurde unter UV-Licht ausgeschnitten und nach dem Protokoll des Wizard™ PCR Preps DNA Purification System (Promega, Madison, WI, USA) präpariert. Alternativ wurde die DNA in gewöhnlichen Agarosegelen aufgetrennt und mit dem QIAEX II Gelextraktionssystem (Qiagen, Hilden) isoliert.

4.6 Klonierung von DNA-Restriktionsfragmenten

Zur Klonierung wurden 2–5 µg Vektor- bzw. Insert-DNA geschnitten. Anschließend wurde der Vektor mit SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) dephosphoryliert. Die Restriktionsfragmente wurden in einem Agarosegel aufgetrennt, gereinigt und eluiert. Die Konzentration von Vektor- und Insert-DNA wurde anhand der Markerbanden abgeschätzt. Die Insert-DNA (ca. 500 ng DNA) wurde mit EtOH gefällt und in Vektor-DNA-Lösung, die ca. 50 ng DNA enthielt, resuspendiert. Die Ligation wurde bei 14°C in einem Volumen von 10–20 µl durchgeführt. Verwendet wurde T₄ Ligase (Amersham), oder das Fast Link™ System (Biozym, Hessisch Oldendorf). Für Religationen wurde ein größeres Ligationsvolumen (100 µl) gewählt und der Schritt der Dephosphorylierung ausgelassen. Zur direkten Klonierung von PCR-amplifizierten „blunt-end“ Fragmenten wurden die Oligonukleotide mit einer Polynukleotid Kinase nach Angaben des Herstellers phosphoryliert. Zum Anfügen von Restriktionsschnittstellen wurden diese so in das Oligonukleotid integriert, daß die PCR-Produkte unmittelbar geschnitten werden konnten. Alternativ wurden PCR-Fragmente mit dem TOPO Cloning Kit der Firma Invitrogen (Leek, Niederlande) nach den Angaben des Herstellers kloniert.

4.7 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzen wurden durch kommerzielle Sequenzierung erhalten (MWG Biotech, Ebersberg), oder mit dem ALFexpress™-Sequenziergerät (Pharmacia Biotech, Freiburg) ermittelt. Dazu wurden die Sequenzen mit dem automatischen Sequenzierer gelesen. Als Primer wurden Cy5-markierte Oligonukleotide von MWG und Pharmacia verwendet. Die Sequenzreaktion wurde mit dem "Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing System" (Amersham, Braunschweig) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Pro Reaktion wurden 0,5 µg Miniprep-DNA eingesetzt. Die Auftrennung erfolgte mittels der Long Ranger™ Gelmatrix der Firma FMC Bio Products (Rockland, USA). Für den Lauf wurden 1600 V, 38 mA, 34 W bei einem Intervall von 2 s und einer Laufdauer von 900 min eingestellt.

4.8 Transfektion von *E. coli*

Elektrokompetente Zellen von *E. coli* wurden, wie bei (Ausubel et al. 1995) beschrieben, hergestellt, indem eine Übernachtskultur zentrifugiert und die Zellen wiederholt bei niedrigen Temperaturen (2°C) mit destilliertem Wasser (Quarzdest) gewaschen wurden. Die Zellen wurden in einer 10 %igen Glycerinlösung resuspendiert und bei -80°C bis zur Verwendung eingefroren. Für eine Transfektion wurde Plasmid-DNA durch Elektroporation (Gene-Pulser, BioRad) in elektrokompetente Zellen des *E. coli* Stammes XL1-Blue (Stratagene; La Jolla, USA) übertragen. Alternativ wurden elektrokompetente Zellen des *E. coli*-Stammes TOP10F^c der Firma Invitrogen (Leek, Niederlande) verwendet.

4.9 Transfektion von *A. nidulans*

Die Transfektion von *A. nidulans* wurde durchgeführt, indem *A. nidulans*-Hyphen protoplastiert und die DNA mit Hilfe von PEG (Polyethylenglykol) in die Protoplasten übertragen wurde (Yelton et al. 1984). Es wurden 500 ml MM mit $\sim 10^9$ Konidien oder im Falle von nicht-konidienbildenden Stämmen mit frischer Hyphensuspension inokuliert. In diesem Fall wurden ein bis zehn frisch bewachsene Agarplatten mit je 10 ml MM überschichtet und das Myzel mit Hilfe einer Metallöse von der Platte abgelöst. Die Inkubation erfolgte je nach Stamm für 12 -15 Stunden bei 30°C auf einem Schütteltisch (300 rpm). Anschließend wurde das Myzel geerntet, indem es durch eine sterile Membran (Miracloth) filtriert und mit Myzel Waschlösung (MWL) gewaschen wurde. Das Myzel wurde in 5 ml Osmotisches Medium (OM) in einem 100 ml Erlenmeyerkolben aufgenommen. Nach Zugabe von Novozym (2 mg/ml), oder Glucanex (8 mg/ml) der Firma Novo Nordisk und fünfminütiger Inkubation auf Eis erfolgte die Zugabe von 0,5 ml Albuminlösung (12 mg/ml). Anschließend wurde 1 –3 h bei 30°C unter vorsichtigem Schütteln (100 rpm) inkubiert. Die freien Protoplasten wurden durch eine Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Aus einem 500 ml Kulturansatz konnten mit dieser Methode im Durchschnitt zwischen 10^6 - 10^7 Protoplasten gewonnen werden. Pro Transformationsansatz wurden 10^5 - 10^6 Protoplasten und 2 –10 µg DNA verwendet. Die transformierten Protoplasten wurden auf osmotisch stabilisierendem Medium ausgekeimt. Die Transformationseffizienz lag zwischen 10 -20 Kolonien pro µg DNA.

Tabelle 9: Lösungen für die Transfektion von *A. nidulans*

MWL (Myzel Wasch Lösung)	0,6 M MgSO ₄
OM (Osmotisches Medium)	1,2 M MgSO ₄ ; 10 mM NaPO ₄ -Puffer, pH 5,8
ÜP (Überschichtungs Puffer)	0,6 M Sorbitol; 0,1 M Tris/HCl, pH 7,0
STC (Sorbitol-Tris-Calcium Puffer)	1,2 M Sorbitol; 10 mM Tris/HCl; 10 mM CaCl ₂ , pH 7,0
PEG	60 % Polyethylenglykol 4000; 10 mM CaCl ₂ , 10 mM Tris/HCl, pH 7,0

4.10 DNA-DNA-Hybridisierung (Southern-Blot Analyse)

Die Hybridisierungen (Sambrook et al. 1989) wurden radioaktiv mit [α -³²P]-dATP oder [α -³²P]-dCTP durchgeführt. Die Herstellung der Sonden erfolgte mittels „random priming“ mit Hexamerprimern, oder in einer PCR-Reaktion mit spezifischen Oligonukleotiden. Die im Agarosegel aufgetrennte DNA wurde durch Kapillarkraft auf eine Nylonmembran (Biodyne A, Pall, Ann Arbor, MI, USA) übertragen und durch UV-Strahlung der Dosis $1,2 \times 10^5 \mu\text{J}$ quervernetzt (UV Stratalinker 2400, Stratagene, Heidelberg). Die Membranen wurden mindestens 1 h bei 68°C prähybridisiert und anschließend 12–20 h bei 68°C mit der Sonde hybridisiert und stringent bei 68°C gewaschen. Die Detektion erfolgte mittels Autoradiographie. Sollte eine Membran ein zweites Mal mit einer Sonde hybridisiert werden, wurde die zuvor verwendete Sonde von der Membran gewaschen. Dazu wurde die Membran in eine auf 95°C erhitzte 0,5 %ige SDS-Lösung transferiert und bis zum Abkühlen der Lösung auf Raumtemperatur auf einem Schüttler (100 rpm) inkubiert. Das vollständige Entfernen der Sonde wurde durch eine Autoradiographie überprüft.

4.11 Isolierung von Gesamt-RNA aus *A. nidulans*

Zur Isolierung von entwicklungsabhängiger RNA wurde Einmachhaut (Ostmann, Bielefeld) passend zugeschnitten, in H₂O autoklaviert, auf Agarplatten aufgebracht und mit Suspensionen von ca. 10^5 Konidiosporen beimpft. Die bewachsenen Einmachhäute wurden zu definierten Zeitpunkten abgezogen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und in einem Mörser pulverisiert. Zur Isolierung von RNA aus Flüssigkulturen wurden Sporen in Erlenmeyerkolben auf Schüttlern (300 rpm) inkubiert. Das Myzel wurde anschließend filtriert, trockengepresst und in flüssigem Stickstoff gemörsert. Aus den so aufgeschlossenen Zellen wurde die RNA mit TRIZOL (Gibco) entsprechend den Angaben des Herstellers isoliert. Die RNA wurde zunächst in 20–50 μl DEPC- H₂O gelöst und 20 U RNase-Inhibitor

(Promega, Mannheim) zugegeben. Nach Bestimmung der RNA-Konzentration in einem Photometer (Pharmacia LKB - UltrospecIII) wurde die RNA mit DEPC- H₂O auf einen Wert von 1 µg/µl eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

4.12 DNA-RNA-Hybridisierung (Northern-Blot Analyse)

Northern-Blot-Hybridisierungen wurden wie bei Sambrock *et al.* (1989) beschrieben durchgeführt. Die RNA wurde mit Formamid denaturiert und in denaturierenden formaldehydhaltigen Agarosegelen aufgetrennt und anschließend durch Kapillarkraft auf eine positiv geladene Nylonmembran (Biodyne Plus, Pall, Ann Arbor, MI, USA) übertragen. Zur Größenabschätzung wurden RNA-Marker der Firma Promega (Mannheim) verwendet. Zur Kontrolle der Qualität der aufgetragenen RNA wurde die Membran mit Methyleneblau (0,03 %) gefärbt. Nach Waschen mit H₂O blieb nur die RNA angefärbt. Die Dokumentation erfolgte durch eine Kamera (INTAS, Göttingen) und einen Videoprinter. Anschließend wurde die Membran vollständig mit Entfärbelösung (1 % SDS, 1xSSC) entfärbt. Alternativ wurden 2 µg RNA in einem denaturierenden Gel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Die Prähybridisierung (min. 1 h) und Hybridisierung (16 –20 h) erfolgte bei 42°C in Hybridisierungslösung mit 50 % Formamid. Das Waschen der Membranen erfolgte mit unterschiedlicher Stringenz bei 60 -65°C. Es wurde zwischen den einzelnen Schritten mit einem Geiger-Müller-Zähler die verbliebene unspezifisch an die Membran gebundene Aktivität abgeschätzt und gegebenenfalls stringenter gewaschen. Die Signale wurden mittels Autoradiographie detektiert. Die Herstellung der Sonden wurde ausschließlich in PCR-Reaktionen durchgeführt, in denen jeweils 50 µCi [α -³²P]-dATP, oder [α -³²P]-dCTP eingesetzt wurden. Zusätzlich enthielten die Reaktionsansätze das unmarkierte Nukleotid in einer Konzentration von 10 µM. Nicht eingebaute Nukleotide wurden mit Hilfe von Mobi Spin S-300 Säulen (Mo Bi Tec, Göttingen) abgetrennt. Die in dieser Arbeit verwendeten Sonden wurden mit folgenden Oligonukleotiden amplifiziert.

Tabelle 10: Für die Herstellung radioaktiver Sonden verwendete Oligonukleotide

nachgewiesenes Transkript	verwendete Oligonukleotide
<i>cpeA</i>	per1-per2
<i>p5cr</i>	perKOtest2-prol
<i>abaA</i>	aba1-aba2
<i>brlA</i>	brl4-brl5
<i>stuA</i>	stu1-stu2
<i>edrA</i>	pro1int1-pro1/3'
<i>edrB</i>	pro2int1-pro2int2
Glukanase	nested1-nested2R (SSH)

4.13 Herstellung eines Fusionskonstrukts von CPEA und GFP

Um das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) in eine *ClaI*-Schnittstelle im 3'-Bereich des ORF von *cpeA* einzufügen, wurde sGFP aus dem Plasmid pNic3 mit den Oligonukleotiden gfpCla1 und gfpCla2 mit der Pfu-Polymerase (Promega, Mannheim) amplifiziert, die PCR-Reaktion in einem Agarosegel aufgetrennt und das 0,7 kb GFP-Fragment eluiert. Das PCR-Produkt wurde anschließend direkt mit *ClaI* geschnitten, die DNA gefällt und in H₂O zur Verwendung in einer Ligation aufgenommen. Um GFP in die *ClaI*-Schnittstelle von *cpeA* in pMS16 einfügen zu können, mußte zunächst eine *ClaI*-Schnittstelle im KS⁻-Polylinker entfernt werden. Hierzu wurde der Vektor mit *ClaI* geöffnet, die 3'-Überhänge der DNA mit einer T₄-Polymerase entfernt (Sambrook et al. 1989) und anschließend religiert. Die *ClaI*-Schnittstelle in der *cpeA*-Sequenz wurde hierbei nicht geöffnet, da diese aufgrund einer Methylierung durch die Dam Methylase von *E. coli* geschützt war. Deshalb erfolgte die Transfektion des religierten Vektors in den *E. coli*-Stamm GM2159 (*dam*⁻). Die isolierte Plasmid DNA wurde mit *ClaI* geschnitten, dephosphoryliert, gefällt und mit dem GFP-Fragment ligiert. Die Orientierung der Integration von GFP wurde in einer PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden gfpCla1 bzw. gfpCla2 und per1 festgestellt. Das so verifizierte Plasmid pMS18 wurde in den *A. nidulans* Stamm SMS8 transformiert und die Funktionsfähigkeit von GFP in dem Fusionskonstrukt fluoreszenzmikroskopisch überprüft.

4.14 Konstrukte zur Überexpression von *nsdD* und *edrA*

Zur Herstellung eines Konstruktes für die Überexpression von *nsdD* wurde zunächst ein 1,9 kb *pyr4*-Fragment aus dem Plasmid TOPO30 in die *NotI*-Schnittstelle des Plasmids pRS72.3 kloniert. Es wurde ein 1,7 kb Fragment, das den vollständigen offenen Leserahmen von *nsdD* und zusätzlich 6 bp vor dem Startkodon und ca. 100 bp stromabwärts des

Stoppkodons enthielt, mit einer Expand Polymerase von genomischer DNA PCR-amplifiziert. Die hierfür verwendeten Oligonukleotide nsdEcoR5.1 und nsdEcoR5.2 enthielten *EcoRV*-Schnittstellen. Das gelulierte PCR-Produkt wurde mit *EcoRV* geschnitten und in eine *EcoRV*-Schnittstelle des aus pRS72.3 erhaltenen Plasmids eingesetzt. Die korrekte Orientierung des *nsdD*-Fragmentes bezüglich des *gpdA*-Promotors wurde in einer PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden nsdEcoR5.2 und *gpdBamH1* überprüft.

Ein Konstrukt zur Überexpression von *edrA* wurde erzeugt, indem zunächst ein 0,9 kb *BamHI*-Fragment des *gpdA*-Promotors aus pRS72.3 in die *BamHI*-Schnittstelle von KS⁻ kloniert wurde. Es wurde ein Klon ausgewählt, in dem der Promotor in Richtung der *XhoI*-Schnittstelle des Polylinkers zeigte. In diesen wurde anschließend ein 1,8 kb *NotI*-Fragment von *argB* aus pRS85 eingesetzt. Es wurde ein 2,3 kb Fragment, das den vorhergesagten offenen Leserahmen von *edrA* vollständig enthält, mit einer HIFI Taq Polymerase (Gibco) in einer PCR mit den Oligonukleotiden pro1/5' und pro1/3' von genomischer DNA amplifiziert und zunächst in den pCR II Vektor kloniert. In die Oligonukleotide waren *XhoI*-Schnittstellen integriert. Das 2,3 kb *XhoI*-Fragment von *edrA* wurde schließlich in die *XhoI*-Schnittstelle des oben beschriebenen Plasmids eingefügt. Die korrekte Orientierung des *edrA*-Fragmentes bezüglich des *gpdA*-Promotors wurde in einer PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden pro1/3' und *gpdBamH1* überprüft.

4.15 Herstellung von Konstrukten zur Deletion von STUA-Bindestellen im *cpeA*-Promotor

Um CPEA-GFP Fusionskonstrukte mit unterschiedlich langen Promotorbereichen zu erhalten, wurde der 5'-Bereich des *cpeA*-Fragmentes im ursprünglichen Fusionskonstrukt pMS18 durch das Einsetzen von PCR-amplifizierten Teilen der Promotorregion erweitert. Hierzu wurden PCR-Reaktionen mit einer HIFI Taq Polymerase (Gibco) durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotide waren perKOtest, perKOtest2, sowie per5', jeweils zusammen mit dem unmittelbar stromaufwärts des Startkodons und 250 bp stromabwärts einer *SmaI*-Schnittstelle im *cpeA*-Promotor bindenden Oligonukleotids procom3. Als Matrize diente pMS46. Die gelulierten PCR-Produkte wurden in den pCR II Vektor kloniert. Es wurden solche Klone ausgewählt, in denen die *EcoRV*-Schnittstelle im Polylinker von pCR II benachbart zum 5'-Ende des *cpeA*-Promotorbereichs war. Die so erhaltenen Plasmide pMS37, 38 und 39 wurden mit *EcoRV* im Polylinker von pCR II und *SmaI* im *cpeA*-Promotor geschnitten. Die freigesetzten „blunt end“ Fragmente wurden in pMS18 kloniert. pMS18 wurde hierzu mit

SmaI geöffnet, so daß ein 100 bp Fragment zwischen dem Polylinker von KS⁻ und der *SmaI*-Schnittstelle im *cpeA*-Promotor entfernt wurde. Durch Einsetzen der *EcoRV/SmaI*-Promotorfragmente wurde pMS18 somit verlängert, ohne Veränderungen in der Sequenz der Promotorbereiche zu erzeugen. Die Orientierung der Promotoren wurde in einer PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden perKOtest, perKOtest2, sowie per5', jeweils zusammen mit *gfpCla2* überprüft.

4.16 Herstellung einer subtraktiven cDNA-Bank

Zur Herstellung einer subtraktiven cDNA-Bank, angereichert in differentiell in der Fruchtkörperentwicklung exprimierten Genen, wurde die Methode der suppressiven subtraktiven Hybridisierung (SSH) (Diatchenko et al. 1996) angewendet. Die SSH ermöglicht die Identifizierung von Genen, die in einer sogenannten Tester-mRNA-Population exprimiert sind, in einer zweiten, der sogenannten Driver-mRNA-Population jedoch fehlen, oder reduziert sind. Sofern nicht gesondert darauf hingewiesen wird, stammen die nachfolgend aufgeführten Komponenten aus dem kommerziell erhältlichen PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (Clontech, Heidelberg). Alle Inkubationen und PCR Reaktionen der SSH wurden in einem Thermal Cycler (Biometra) durchgeführt.

Isolierung der RNA

Sporen der Stämme FGSCA4 (Wildtyp, Tester) und AJC48 (*medA26*-Mutante, keine Kleistothezien, Driver) wurden 20 h in Flüssig-MM inkubiert, das Myzel anschließend mit passend zugeschnittenen Miracloth-Filtern abfiltriert und zur synchronen Induktion der Entwicklung auf Agarplatten überführt. Während der nachfolgenden Inkubation bei Dunkelheit wurde zu den Zeitpunkten 0, 6, 12, 22, 30, 48 und 60 h Myzel entnommen, zwischen Papiertüchern trockengepresst und in flüssigem Stickstoff gemörsert. Für die Isolierung von Gesamt-RNA mit dem Rneasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) wurden Aliquots des gemörserten Myzels der einzelnen Zeitpunkte jeweils eines Stammes vereint. Die RNA wurde anschließend mit DNase (Promega) 30 Minuten bei 37°C inkubiert und erneut über Säulen (Qiagen) gereinigt.

cDNA-Synthese

Tester und Driver ds cDNA wurde mit Hilfe des SMART™ cDNA Synthesis Kit (Clontech) hergestellt. Für die Erststrangsynthese wurden je 2 µg Gesamt-RNA verwendet. Die RNA

wurde in 3 μl H_2O aufgenommen, mit je 1 μl SMART und CDS Oligonukleotid (je 10 μM) vermischt und zwei Minuten bei 70°C inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde auf RT abgekühlt, 2 μl 5x Puffer, 1 μl DTT (20 mM), 1 μl dNTP (10 mM) und 200 U Reverse Transkriptase (Superscript, Gibco) zugegeben. Die Erststrangsynthese wurde eine Stunde bei 42°C durchgeführt, der Reaktionsansatz anschließend mit TE auf 50 μl aufgefüllt und sieben Minuten auf 72°C erhitzt. Die Zweitstrangsynthese ist mit einer Amplifikation der cDNA gekoppelt. Um zu gewährleisten, daß die Häufigkeit individueller mRNAs proportional in der erzeugten cDNA-Population repräsentiert wird, wurde die Amplifikation in der exponentiellen Phase abgestoppt. Um die Anzahl der Amplifikationszyklen bis zum Erreichen der exponentiellen Phase zu ermitteln, wurden je vier identische Ansätze in 100 μl mit 2 μl ss cDNA und Advantage cDNA Polymerase Mix (Clontech) nach den Angaben des Herstellers präpariert. Diese wurden einer Amplifikation mit 12, 16, 20 bzw. 24 Zyklen unterzogen. Die PCR-Bedingungen waren: 95°C (15 s), 65°C (30 s), 68°C (6 min). 15 μl Aliquots der Reaktionen wurden in einem Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht und anhand der DNA-Menge der exponentielle Bereich der PCR festgestellt. Dieser lag zwischen 12 und 16 Zyklen. Die nach 12 Zyklen abgestoppte Reaktion wurde zwei weiteren Zyklen unterzogen. Das PCR-Produkt wurde anschließend mit QIAquick PCR Reinigungssäulen (Qiagen) gereinigt und in 100 μl NTE-Puffer eluiert.

***RsaI* Restriktionsverdau**

Je 43,5 μl der Tester- und Driver ds cDNA wurden in 50 μl Reaktionsvolumen 1,5 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *RsaI* geschnitten. Die Reaktion wurde mit 2 μl 0,5 M EDTA gestoppt und das Produkt anschließend mit QIAquick PCR Reinigungssäulen (Qiagen) gereinigt.

Adapter Ligation

1 μl der geschnittenen Tester cDNA wurde mit 5 μl H_2O verdünnt; jeweils 2 μl davon wurden mit Adapter 1 bzw. Adapter 2R ligiert. Die Ligation erfolgte mit T_4 Ligase über Nacht bei 16°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 μl einer EDTA/Glycogen Mischung (0,2 M/ 1 mg/ml) und fünfminütiges Erhitzen auf 72°C gestoppt.

Subtraktive Hybridisierung

Je 1,5 μl der mit Adapter 1 bzw. Adapter 2R ligierten Tester cDNA wurden mit 1,5 μl Driver cDNA und 1 μl Hybridisierungspuffer gemischt und mit Mineralöl überschichtet. Nach

1,5 min Denaturierung bei 98°C wurde 8 h bei 68°C hybridisiert. Für die zweite Hybridisierung wurden die beiden Proben kombiniert und 1 µl denaturierte Driver cDNA sowie 1,5 µl Hybridisierungspuffer und 1 µl H₂O zugegeben. Diese Hybridisierung wurde über Nacht bei 68°C durchgeführt. Das Produkt der letzten Hybridisierung wurde mit 200 µl Verdünnungspuffer versetzt und für 7 min auf 68°C erwärmt.

PCR Amplifikation

1 µl der verdünnten Hybridisierungslösung wurde in einer ersten PCR Reaktion mit dem PCR Primer 1 und dem Advantage cDNA Polymerase Mix in 25 µl Reaktionsvolumen amplifiziert. Nach 5 minütiger Inkubation bei 75°C zum Auffüllen der Adapterenden wurden 27 Amplifizierungszyklen mit folgenden Bedingungen durchgeführt: 94°C (30 sec), 66°C (30 sec), 72°C (1,5 min). 3 µl des Reaktionsproduktes wurden entnommen und 1:10 in H₂O verdünnt. 1 µl des verdünnten PCR Produktes wurde in einer zweiten PCR Reaktion mit den Primern Nested 1 und Nested 2R mit Hilfe des Advantage cDNA Polymerase Mixes amplifiziert. Es wurden weitere 12 Zyklen mit den o.g. Bedingungen durchgeführt. Das PCR Produkt wurde mit QIAquick PCR Reinigungssäulen gereinigt und in 30 µl H₂O eluiert und anschließend in den pCR II Plasmidvektor kloniert.

4.17 Überprüfung der Subtraktionseffizienz mittels South-Northern-Blot

Die cDNA Fragmente von subtraktiven Klonen wurden in einer PCR Reaktion mit den Oligonukleotiden Nested 1 und Nested 2R in einem Rapid Cycler in einem Reaktionsvolumen von je 40 µl amplifiziert. Zur Denaturierung wurde 2 min auf 94°C erhitzt, danach wurden 35 Zyklen mit folgenden Bedingungen durchgeführt: 94°C (5 sec), 67°C (5 sec), 72°C (45 sec), gefolgt von einer 4 minütigen Endpolymerisation bei 72°C.

Für die Hybridisierung mit radioaktiv markierter Tester- bzw. Driver cDNA wurden in einem Southern-Blot identische Membranen mit je acht SSH Klonen hergestellt. Hierzu wurden Aliquots von je 10 µl der PCR Reaktionen nebeneinander in einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Diese wurde für die Hybridisierung in zwei gleiche Teile zerschnitten.

Zur Herstellung der radioaktiven Sonden wurden je 0,5 µl Tester- bzw. Driver ds cDNA entsprechend 4.16 (Zweitstrang cDNA Synthese), amplifiziert. Die Reaktionen enthielten 50 µCi [α -³²P]-dCTP und unmarkiertes dCTP (10 µM). Die Hybridisierung und das Waschen der Membranen erfolgte bei 65°C. Detektiert wurde mittels Autoradiographie.

5. Biochemische Methoden

5.1 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde mit der Methode nach Bradford bestimmt. Der Test beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Coomassie Brilliantblau G 250 von 465 nm zu 595 nm durch Bindung an Protein in saurer Lösung (Bradford 1976). Die Bestimmung wurde mit dem BIO-RAD Microassay (BIO-RAD Laboratories) durchgeführt. Probe oder Standard (0-10 µg Protein/0,8 ml H₂O) wurden mit 200 µl BIO-RAD Proteinassay-Farbstoffkonzentrat versetzt und nach 15 min die Extinktion bei 595 nm gegen H₂O als Leerwert bestimmt. Als Standard diente Serumalbumin (Rind).

5.2 SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Das SDS-Gel bestand aus einem Trenn- und Sammelgel. Zunächst wurde das Trenngel zwischen die Glasplatten der BIO-RAD (Mini Protean II) Apparatur gegossen und mit Wasser überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Wasser entfernt und die Gelkammer mit Sammelgel aufgefüllt. Die zu analysierenden Proteinfractionen wurden in Probenpuffer aufgenommen, fünf Minuten auf 90°C erhitzt und direkt auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei Raumtemperatur zunächst mit 70 Volt für 30 min und anschließend mit 150 Volt für 90 min durchgeführt. Danach wurden die Gele ca. 20 min mit Coomassie Brilliantblau gefärbt. Anschließend wurde das Gel entfärbt (Laemmli, 1970).

Tabelle 11: Lösungen für die SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Benötigte Lösungen	Zusammensetzung
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (Sigma)	40% Stammlösung; Verhältnis 37:1
Trenngel	10 %ig enthielt: 1,9 ml der Acrylamidlösung; (für 1 mm Spacer) 1,88 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8); 3,6 ml H ₂ O; 0,125 ml 10 % SDS; 5 µl TEMED; 40 µl 10 % APS
Sammelgel	4 %ig enthielt: 0,36 ml der Acrylamidlösung; 0,45 ml 1,5 M Tris-HCl (für 1 mm Spacer) (pH 6,8); 2,8 ml H ₂ O; 36 µl 10% SDS; 3 µl TEMED; 20 µl 10 % APS
Probenpuffer (4x)	0,24 M Tris-HCl (pH6,8); 8 % SDS; 40 % Glycerin; 12% DTT; 0,004 % Bromphenolblau
Laufpuffer (10x)	1,9 M Glycin; 0,25 M Tris; 0,04 M SDS; (pH 8,3)
Färbelösung	0,5 % CuSO ₄ ; 0,05 % Serva R250; 0,05 % Crocein Scarlet; 25 % 2-Propanol; 10 % Essigsäure;

Benötigte Lösungen	Zusammensetzung
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (Sigma)	40% Stammlösung; Verhältnis 37:1
Trenngel	10 %ig enthielt: 1,9 ml der Acrylamidlösung; (für 1 mm Spacer) 1,88 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8); 3,6 ml H ₂ O; 0,125 ml 10 % SDS; 5 µl TEMED; 40 µl 10 % APS
Sammelgel	4 %ig enthielt: 0,36 ml der Acrylamidlösung; 0,45 ml 1,5 M Tris-HCl (für 1 mm Spacer) (pH 6,8); 2,8 ml H ₂ O; 36 µl 10% SDS; 3 µl TEMED; 20 µl 10 % APS
Probenpuffer (4x)	0,24 M Tris-HCl (pH6,8); 8 % SDS; 40 % Glycerin; 12% DTT; 0,004 % Bromphenolblau
Laufpuffer (10x)	1,9 M Glycin; 0,25 M Tris; 0,04 M SDS; (pH 8,3)
Entfärbelösung	12 % 2-Propanol; 7 % Essigsäure; 0,05 % CuSO ₄
Proteingrößenstandard (Sigma)	High Molecular Weight Standard Mixture for SDS Gel Electrophoresis (SDS-6H) gelöst in 1x Probenpuffer

5.3 Immundetektion von Proteinen (Western-Blot Analyse)

Zur *in vitro* Detektion des CPEA-GFP Fusionsproteins wurden Western-Blot Analysen durchgeführt. Wachstumsbedingungen und Zellaufschluß zur Gewinnung von Proteinrohextrakten aus *A. nidulans* waren wie unter 4.11 beschrieben. Das gemörserte Myzel wurde im gleichen Volumen Proteinextraktionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; Proteaseinhibitoren: 2,5 mM Pefabloc; 10 µg/ml Leupeptin; 10 µg/ml Pepstatin A) in einem Eppendorf-Cup aufgenommen, fünf Minuten gemixt und anschließend fünf Minuten bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Eppendorf-Cup überführt. Je 40 µg Proteinrohextrakt wurden in einem 10 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Dieses wurde anschließend in einer Mini-Blot-Apparatur (BIO-RAD) bei 4°C und 100 mA in 2-3 h auf eine Nitrocellulosemembran (Hybond ECL, Amersham) übertragen. Um den Proteingrößenstandard sichtbar zu machen, wurde die Membran mit Ponceau-S-Lösung gefärbt und die Banden des Standards markiert. Die Membran wurde anschließend zweimal zehn Minuten mit TBS (Tris-buffered saline)-Lösung gewaschen und eine Stunde in 3 % Blocking-Lösung inkubiert. Als Erstantikörper wurde ein in Kaninchen erzeugter Anti-GFP-Antikörper (ABR, Golden, CO, USA), 1:1000 verdünnt in 3 % Blocking-Lösung, verwendet. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Im Anschluß wurde dreimal fünf Minuten mit TBS-T-Lösung gewaschen und zehn Minuten in Blocking-Lösung inkubiert. Als Zweitantikörper diente ein Peroxidase-konjugierter Anti-Kaninchen-Antikörper, der 1:1000 in Blocking-Lösung verdünnt wurde. Nach 30 minütiger Inkubation folgten drei 15 minütige Waschschrte in TBS-T-Lösung. Die Detektion erfolgte

mit Hilfe von Chemilumineszenz nach den Angaben des Herstellers der Reaktionslösungen (Roche, Mannheim).

Tabelle 12: Lösungen für die Immundetektion

Lösung	Zusammensetzung
Ponceau-S	3 % Trichloressigsäure; 3 % Sulfanilsalicylsäure; 0,2 % Ponceau-S
TBS	50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl
TBS-T	TBS + 0,1 % Tween 20
Blocking-Lösung	TBS + 3 % „Skim milk“

5.4 Reinigung von CPEA

Herstellung von Zellextrakt

Zur Reinigung von CPEA wurde der Stamm SMS1 auf Minimalmedium in Dunkelheit kultiviert, die Inkubationszeit betrug 72 h. Die Agaroberfläche wurde mit einer Lage Einmachhaut (Ostmann, Bielefeld) bedeckt, auf die eine Sporensuspension aufgebracht wurde. Angeimpft wurde mit ca. 10^8 Sporen auf einer Fläche von $0,7 \text{ m}^2$. Um die Zellen zu ernten, wurde das Myzel mit einem Spatel von der Einmachhaut abgenommen, zwischen Papiertüchern trocken gepreßt und nach Bestimmung der Feuchtzellmasse in 2 ml Proteinextraktionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; Proteaseinhibitoren: 2,5 mM Pefabloc; 10 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin; 10 $\mu\text{g/ml}$ Pepstatin A) je g Feuchtzellen suspendiert. Das suspendierte Myzel wurde durch Mixen (Ultra-Turrax T25, Janke & Kunkel) bei 13 500 U/min homogenisiert. Der Zellaufschluß erfolgte mittels French-Pressure-Zelle (SLM Aminco) bei einem Druck von 1200 psi in zwei Durchgängen. Der Aufschluß der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert. Es folgte eine Zentrifugation über 15 min mit $16\,000 \times g$ (Sorvall RC 5B Plus, Rotor HB6). Der Überstand der Zentrifugation wurde anschließend in Polycarbonat-Zentrifugenröhrchen 1 h bei $67\,000 \times g$ zentrifugiert (Sorvall Ultra Pro 80, Rotor Ti 45). Der erhaltene Überstand wurde filtriert (Sarstedt Filtropur S 0,45; $0,45 \mu\text{m}$ Porendurchmesser). Das Filtrat wird nachfolgend als Rohextrakt bezeichnet. Alle Arbeiten wurden bei 4°C oder auf Eis durchgeführt.

Die im folgenden aufgeführten Säulen wurden über eine FPLC-Anlage (Pharmacia, Freiburg) betrieben. Die Detektion von Protein erfolgte durch Absorptionsmessung bei 280 nm in einer Durchflußküvette. Um Fraktionen mit CPEA-Aktivität zu identifizieren, wurden $20 \mu\text{l}$ der Fraktion in ein Eppendorf-Cup mit 1 mM N,N-Dimethyl-p-phenylendiamin (DMP) in $200 \mu\text{l}$ Citrat-Puffer (37 mM Citronensäure-Monohydrat; 126 mM Na_2HPO_4 ; pH 6,0) gegeben. Von

Fraktionen, die in diesem Test eine Rotfärbung zeigten, wurde die Enzymaktivität bestimmt. Die Reinigung wurde bei 4°C durchgeführt.

Anionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Sepharose:

Zur Reinigung von CPEA wurde aus ca. 120 g Feuchtzellen gewonnener Rohextrakt eingesetzt. Dieser wurde auf eine zuvor mit 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,5 equilibrierte DEAE-Sepharose Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte durch einen von 0 auf 300 mM NaCl ansteigenden Salzgradienten in einem Volumen von 100 ml. Die Flußrate betrug 3 ml/min, CPEA eluierte ab 180 mM NaCl.

Ammoniumsulfatfällung:

Der DEAE-Fraktion wurde kristallines $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bis zu einer Sättigung von 40 % langsam und unter ständigem Rühren zugegeben. Nach weiteren 30 min Rühren wurde das ausgefallene Protein 20 min bei 16 000 x g abzentrifugiert. Etwa 90 % der CPEA-Aktivität befand sich im Überstand.

Hydrophobe Chromatographie an Phenylsepharose:

Der Überstand der Ammoniumsulfatfällung wurde auf eine Phenylsepharose-Säule aufgetragen. Diese wurde zuvor mit 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,5 + 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ equilibriert. Die Elution erfolgte durch einen von 1,2 M auf 0 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ abfallenden Gradienten in 50 ml Volumen bei einer Flußrate von 3 ml/min. CPEA-Aktivität wurde erst in Fraktionen, die ohne $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eluieren, detektiert. Diese wurden daraufhin vereint. Es folgte eine Ultrafiltration (Amicon 8200, 30 kDa Ausschlußgröße). In diesem Schritt wurde das Protein in 10 mM Acetat-Puffer pH 5,0 aufgenommen.

Kationenaustausch-Chromatographie an SP-Sephacel:

Zur weiteren Reinigung des Proteins wurde eine Chromatographie an einer Kationenaustauscher-Säule durchgeführt. Die SP-Sephacel-Säule wurde mit 10 mM Acetat-Puffer pH 5,0 equilibriert, um anschließend die vereinten Phenylsephacel-Fraktionen aufzutragen. Durch eine Erhöhung der NaCl-Konzentration von 0 -500 mM in 100 ml Volumen wurde das gebundene Protein eluiert, wobei CPEA-Aktivität in Fraktionen mit 320 - 380 mM NaCl zu finden war. Diese Fraktionen wurden vereint, durch Ultrazentrifugation entsalzt und in 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,5 aufgenommen.

Anionenaustausch-Chromatographie an Mono Q bei pH 7,5:

Die entsalzten SP-Sephacel-Fractionen wurden auf eine mit 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,5 equilibrierte Mono Q-Säule aufgetragen und das adsorbierte Protein mit einem 0 -600 mM NaCl-Gradienten in 80 ml wieder mobilisiert. Bei 200 -260 mM NaCl eluierende Fraktionen mit CPEA-Aktivität wurden vereint.

Enzymtest für CPEA

Die photometrischen Tests zur Bestimmung der Enzymaktivität wurden in Küvetten (Sarstedt) der Schichtdicke 1 cm und einem Volumen von 1 ml durchgeführt. Die durch Oxidation von N,N-Dimethyl-p-phenylendiamin (DMP) hervorgerufene Extinktionserhöhung bei 550 nm wurde mit einem Spektralphotometer (Pharmacia Ultraspec 2000) verfolgt. Die Messungen wurden bei 25°C vorgenommen. Die DMP-Konzentration im Test betrug 4,3 mM.

Zusammensetzung des Standardtestansatzes:

900 µl Citrat-Puffer (37 mM Citronensäure-Monohydrat; 126 mM Na₂HPO₄; pH 6,0)

50 µl DMP (86 mM in H₂O)

50 µl Enzym

Die Reaktion wurde durch Zugabe von Enzym gestartet.

Aufnahme eines UV-Vis Spektrums von gereinigtem CPEA

Das Spektrum wurde in einem Wellenlängenbereich von 200 –700 nm an einem Gilford Response Photometer ermittelt. Das Protein wurde in Citrat-Puffer aufgenommen.

6. Mikroskopische Methoden

Präparation von *A. nidulans* für die Hellfeld-, Interferenz-, Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie

Untersuchung von Konidiophoren und Hyphen

Sterile Objektträger wurden mit einem dünnen Film Vollmedium (+1 % Agarose) überschichtet und auf zwei Glasstäbe in eine Petrischale transferiert. Nachdem der Objektträger punktförmig mit Mycel inokuliert worden war, wurde das Gefäß bis zur Unterkante des Objektträgers mit CM befüllt und bei 37°C inkubiert. Die Kolonien wurden nach 24–30 h mit einer Formaldehydlösung (1 ml 200 mM PIPES, 1 ml Formaldehyd (37 %), 3 ml H₂O) fixiert, mit DAPI gefärbt (Clutterbuck, 1994; Fischer and Timberlake, 1995) und in Mikroskopen des Typs Axiophot und Axiovert 135 (Zeiss, Jena) untersucht. (Timberlake and Marshall 1989)

Zur Untersuchung von GFP-markierten Stämmen, wurden die Kolonien wie oben beschrieben angeimpft und nach Inkubation in einen 10 mM Tris Puffer überführt. Nach Zugabe eines Tropfens Tween 20 wurden die Präparate mikroskopisch untersucht.

Untersuchung von Keimlingen

Eine kleine Petrischale wurde mit CM befüllt und ein steriles Deckglas (24 x 40 mm) eingebracht. Nach Inokulation mit einer Impföse voll Sporen wurde die Petrischale bei 37°C für 6–8 h inkubiert. Anschließend wurde das Deckglas mit den Keimlingen aus der Schale genommen und mit dem Axiovert-Mikroskop (Zeiss, Jena) untersucht.

IV. Ergebnisse

1. Molekulare Analyse von *cpeA*

Ziel der Arbeit war es, die Fruchtkörperbildung in *Aspergillus nidulans* besser auf molekularer Ebene zu verstehen. Langfristiges Ziel des Projektes war dabei die Identifizierung von Regulatoren der sexuellen Entwicklung. Die Phenoloxidase Laccase II, deren Aktivität spezifisch in Hülle-Zellen und Fruchtkörpern nachgewiesen wurde, wurde zunächst gereinigt und biochemisch charakterisiert (Scherer and Fischer 1998). Anschließend wurde die molekulare Analyse des für Laccase II kodierenden Gens *cpeA* durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, daß es sich nicht um eine Cu-haltige Laccase, sondern um eine Häm enthaltende Katalase-Peroxidase handelt.

1.1 Ermittlung der genomischen Sequenz von *cpeA*

Mit Hilfe der Sequenzen von drei aus der Katalase-Peroxidase erhaltenen internen Peptide (Abb. 4) sollte durch PCR mit daraus abgeleiteten degenerierten Oligonukleotiden ein Fragment des für Katalase-Peroxidase kodierenden Genes aus genomischer DNA amplifiziert werden, um dieses als Sonde für die Identifizierung eines korrespondierenden Cosmid-Klones in einer Cosmid-Genbank von *A. nidulans* zu verwenden (Abb. 2). Da zeitgleich mit diesem Versuch die Sequenzierung des *A. nidulans* Genomes durch Cereon Genomics LLC. (Cambridge, USA) zu großen Teilen erfolgt war und freundlicherweise eine Sequenz von 579 bp, die zwei der Peptide von Laccase II enthält, zur Verfügung gestellt wurde, erfolgte die Suche nach einem entsprechenden Cosmid-Klon unter Verwendung eines PCR-Fragmentes, das mit daraus abgeleiteten Oligonukleotiden erzeugt wurde. In der ungeordneten Cosmid-Genbank pKBY (FGSC, Kansas, USA) konnten so zwei positive Klone identifiziert werden, von denen einer, pMS49, weiter bearbeitet wurde. Es wurden ein 5,5 kb *EcoRV*- (pMS46), ein 3 kb *PstI*- (pMS16), sowie ein 2,6 kb *BamHI*-Restriktionsfragment (pMS47) in Plasmidvektoren subkloniert (Abb. 3). Zur Ermittlung der genomischen Sequenz von *cpeA* wurde pMS16 und ein 1,3 kb Fragment aus pMS46 doppelsträngig sequenziert. Zusätzliche Sequenzinformation stromauf-, bzw. stromabwärts wurde lediglich auf einem Strang ermittelt. Eine mit der vollständigen Sequenz (Abb. 4) durchgeführte Homologiesuche mit dem

BLAST-search-Programm (<http://dove.embl-heidelberg.de/Blast2/>) ergab große Übereinstimmungen mit bakteriellen Katalase-Peroxidasen (Abb. 5). Aufgrund der gefundenen Homologien wurde das Laccase II-Gen *cpeA* (*catalase-peroxidase A*) genannt. Es konnte ein durchgehender offener Leserahmen von 739 Aminosäuren abgeleitet werden, der alle drei aus Laccase II erhaltenen Peptidsequenzen enthielt (Abb. 4) und dessen berechnete molekulare Masse von 81,9 kDa dem für das gereinigte Enzym gefundenen Wert von ca. 80 kDa entspricht (Scherer and Fischer 1998). Da sich im vorderen Bereich des offenen Leserahmens ein durch Konsensus-Spleiß-Sequenzen begrenztes putatives Intron ableiten ließ, wurde von cDNA ein 1,1 kb Fragment ausgehend vom Startkodon mit spezifischen Oligonukleotiden amplifiziert und dessen Sequenz bestimmt (pMS50). Die Existenz eines Introns konnte nicht bestätigt werden. Eine Analyse möglicher Transkriptionsstartpunkte (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) ergab einen Wahrscheinlichkeitswert von 0,99 für Position 1998, so daß sich ein nicht translaterter 5'-Bereich von 165 bp ergäbe. Die Sequenz stromaufwärts des *cpeA* Startkodons wurde auf das Vorhandensein von Konsensus-Bindesequenzen bekannter Transkriptionsregulatoren von *A. nidulans* hin untersucht. Es konnten vier putative Bindestellen des Katabolitrepressors CREA mit dem Konsensus SYGGRG (Kulmburg et al. 1993) im Bereich bis ca. 150 bp vor dem putativen Transkriptionsstart identifiziert werden, zwei weitere sind ca. 500 bp entfernt. Zwei mögliche Bindestellen des Transkriptionsfaktors STUA mit dem Konsensus WCGCGWNM (Dutton et al. 1997) befinden sich etwa 1 kb stromaufwärts als invertierte Sequenzwiederholungen (Abb. 4). Vier potentielle Bindestellen des GATA-Transkriptionsfaktors AREA mit dem Konsensus HGATAR (Gonzalez et al. 1997) wurden in einem Bereich bis 500 bp stromaufwärts des CPEA Startkodons gefunden (Abb. 4).

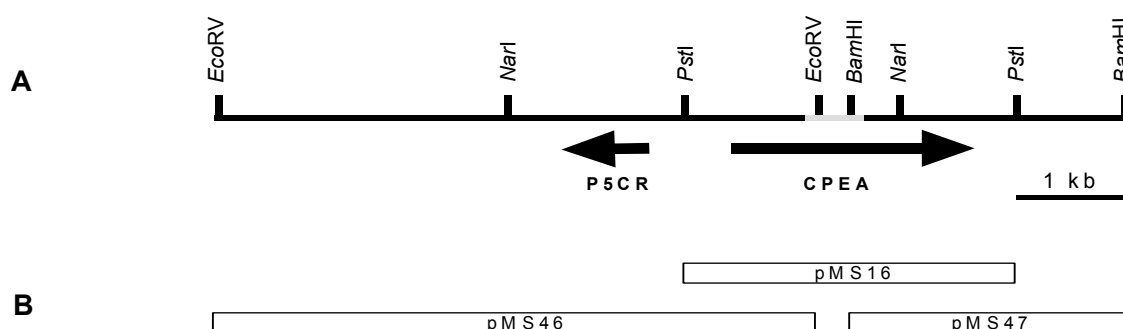


Abb. 3: Partielle Restriktionskarte des *cpeA*-Genortes (A) und aus einem Cosmid der ungeordneten genomischen *A. nidulans* Genbank erhaltene Subklone (B). Der von Cereon Genomics LLC. (Cambridge, USA) zur Verfügung gestellte Sequenzabschnitt ist in A hellgrau dargestellt. Die Basenfolge von pMS16 und einem stromaufwärts angrenzenden Bereich von 1,3 kb aus pMS46 wurde auf beiden Strängen analysiert. Die Sequenz von pMS47, sowie 2,9 kb von pMS46 bis zur *NarI*-Restriktionsschnittstelle wurden einzelsträngig ermittelt. Die offenen Leserahmen von *cpeA* und *Anp5cr* sind durch Pfeile dargestellt.

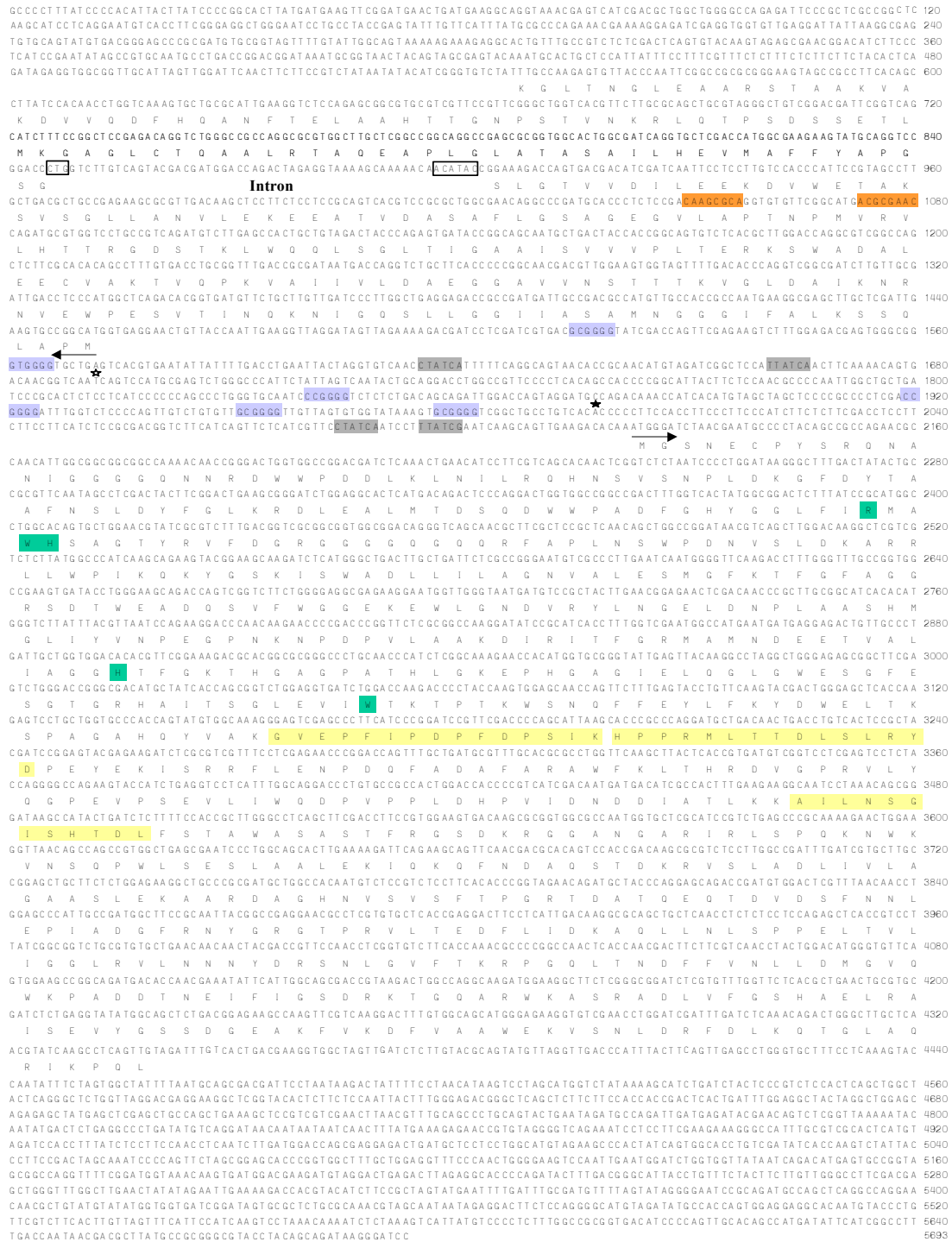


Abb.4 Genomische und abgeleitete Proteinsequenz von *cpeA* und *Anp5cr*. Die DNA-Sequenz wurde von der Position 419-4752 auf beiden Strängen ermittelt, davon stromauf-, bzw. stromabwärts liegende Sequenzabschnitte wurden nur einzelsträngig sequenziert. Die Aminosäuresequenz der offenen Leserahmen ist im Ein-Buchstaben-Code unter der DNA-Sequenz angegeben. Das Pyrrolin-5-Carboxylat-Reduktase Protein wird vom komplementären DNA-Strang in reverser Orientierung bezüglich *cpeA* codiert. Der putative Transkriptionsstartpunkt für *cpeA* ist mit (★), der von *Anp5cr* mit (☆) gekennzeichnet. Konsensus-Spleiß-Sequenzen an Intronengrenzen sind umrahmt dargestellt. Mögliche Bindestellen für den Katabolitrepresor CREA sind blau, solche für den Transkriptionsfaktor STUA orange hervorgehoben. Putative Bindestellen des GATA-Faktors AREA sind grau unterlegt. Hochkonservierte Aminosäuren im aktiven Zentrum bekannter Katalase-Peroxidasen sind grün hinterlegt. Die Sequenzen von drei in einer vorangegangenen Arbeit aus gereinigtem Enzym erhaltenen Peptiden sind durch gelbe Unterlegung kenntlich gemacht. Die Sequenz eines 3 kb *PstI* Restriktionsfragmentes des *cpeA*-Locus ist in der EMBL-Sequenzdatenbank unter der Nummer AJ305225 hinterlegt.

Neben *cpeA* wurde in der Sequenz ein weiterer langer offener Leserahmen auf dem komplementären DNA-Strang identifiziert, der nach Entfernen eines durch Spleißkonsensus-Sequenzen begrenzten 54 bp langen Introns für ein abgeleitetes Protein von 282 Aminosäuren mit einer berechneten molekularen Masse von 29,2 kDa kodiert (Abb. 4). Eine Homologiesuche ergab signifikante Ähnlichkeit mit Pyrrolin-5-Carboxylat Reduktasen (P5CR), Enzymen der Prolin-Biosynthese. Das Gen wurde deshalb *Anp5cr* genannt. Die größte Identität besteht mit 45,7 % zu P5CR aus *Pseudomonas aeruginosa*, während die Übereinstimmung mit bekannten pilzlichen Proteinen mit 30,1 % zu Pro3 aus *Saccharomyces cerevisiae* und 25,5 % zu PRO-1 aus *Neurospora crassa* deutlich geringer ist. Die Startkodons der beiden Gene sind durch eine intergene Region von 670 bp voneinander getrennt. Da die Transkription der Gene in entgegengesetzte Richtung erfolgt, wurde geschlossen, daß die Promotoren sehr kurz sind oder überlappen.

1.2 Charakterisierung des CPEA-Proteins

Ein Vergleich von CPEA mit bakteriellen Katalase-Peroxidase Proteinsequenzen ergab als höchste Übereinstimmung 64,0 % identischer Aminosäuren mit CPEB aus *Streptomyces reticuli* (Zou et al. 1999). Neben vergleichbaren Ähnlichkeiten zu weiteren Sequenzen aus Eubakterien fand sich auch eine 54,1%ige Übereinstimmung mit einer Katalase-Peroxidase aus dem Archaeon *Halobacterium salinarum*. CPEA ist die erste vollständige experimentell ermittelte Primärsequenz einer Katalase-Peroxidase aus Eukaryoten. Eine weitere Sequenz einer eukaryotischen Katalase-Peroxidase wurde in der im Februar 2001 veröffentlichten Datenbank des Genomprojektes von *N. crassa* (<http://www-genome.wi.mit.edu/annotation/fungi/neurospora/>) identifiziert. Ein davon abgeleiteter offener Leserahmen kodiert für ein Protein von 754 Aminosäuren und ist zu 69,7 % identisch mit CPEA. Außerdem ist die Reinigung einer Katalase-Peroxidase aus den Ascomyceten *Penicillium simplicissimum* und *Septoria tritici* beschrieben (Levy et al. 1992; Fraaije et al. 1996), so daß von einer weiten Verbreitung dieser Enzyme in Pilzen ausgegangen werden kann.

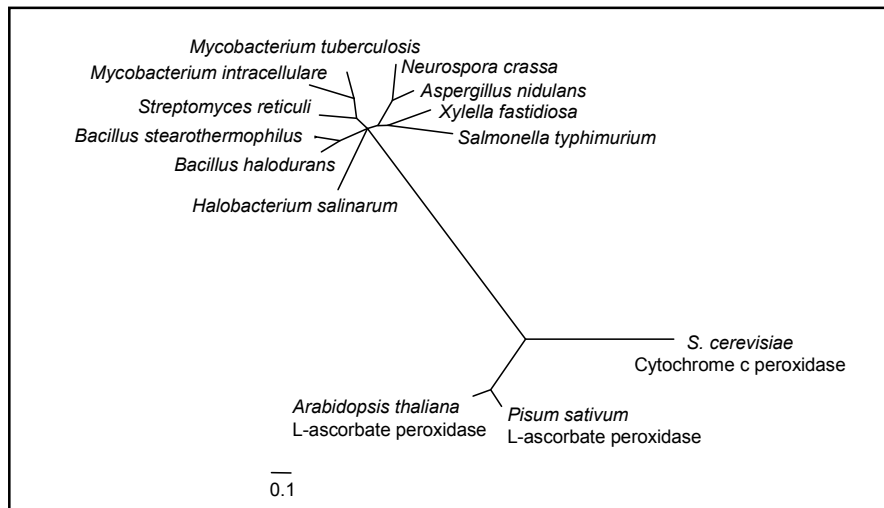


Abb. 5: Dendrogramm von Katalase-Peroxidasen und nahe verwandten Enzymen. Proteinsequenzen von Katalase-Peroxidasen von *Mycobacterium tuberculosis* (Q08129), *Mycobacterium intracellulare* (Q04657), *Streptomyces reticuli* (Y14317), *Bacillus stearothermophilus* (P14412), *Bacillus halodurans* (AP001510), *Halobacterium salinarum* (AF069761), *Xylella fastidiosa* (AE004035), *Salmonella typhimurium* (X53001), *Neurospora crassa* (abgeleitet von Contig 1.78 des *N. crassa* Genomsequenzierprojektes, (<http://www-genome.wi.mit.edu/annotation/fungi/neurospora/>), *Aspergillus nidulans* (diese Arbeit), sowie der *S. cerevisiae* Cytochrome-c-peroxidase (P00431) und der L-Ascorbat-Peroxidasen von *Arabidopsis thaliana* (Q05431) und *Pisum sativum* (P48534) wurden mit dem Programm Clustalw (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) verglichen. Das Dendrogramm wurde mit dem Programm PUZZLE berechnet und mit Hilfe des Programms TREEVIEW dargestellt. Das Skalenteil entspricht 10% kalkulierter Sequenzabweichung.

Bisher charakterisierte Katalase-Peroxidasen sind aus zueinander ähnlichen N-, und C-terminalen Hälften aufgebaut, die beide wiederum Homologie zur 361 Aminosäuren langen Cytochrom-c-Peroxidase (Ccp1) aus *S. cerevisiae* besitzen. Es wird deshalb vermutet, daß die Enzyme einen gemeinsamen Vorfahren haben, und Katalase-Peroxidase Gene evolutiv durch eine Genduplikation entstanden sein könnten. Auch CPEA weist einen Aufbau aus zueinander ähnlichem N- und C-terminalem Bereich auf. Der N-terminale Teil ist auf einer Länge von 442 Aminosäuren zu 24 % identisch mit Ccp1, in den verbleibenden 297 C-terminalen Aminosäuren sind es 19 % Übereinstimmung (Abb. 6A). Die Sequenzvergleiche von CPEA und bekannten Katalase-Peroxidasen (Daten nicht gezeigt) ergab eine Konservierung des Proteins in allen Aminosäureresten, die als essentiell für die Ausbildung des aktiven Zentrums und Bindung der Hämgruppe beschrieben sind (Zamocky et al. 2001). Hochkonserviert ist hier eine Triade der Aminosäuren Arg-Trp-His im aktiven Zentrum, die in CPEA an den Positionen R91, W94, H95 vorhanden ist, sowie ein Histidin als proximaler Häm-Ligand und ein für die Peroxidase-Aktivität wichtiges Tryptophan (Mauro et al. 1988), die den Positionen H258 und W309 in CPEA entsprechen (Abb. 4). Das gereinigte Protein wies ein Absorptionsmaximum bei 406 nm auf, wie es für Katalase-Peroxidasen charakteristisch ist (Abb. 7B). Es wurde ein dreidimensionales Modell von CPEA im Bereich der Aminosäuren 76 – 182 durch eine vergleichende Strukturanalyse der Sequenz mit Hilfe des Programms

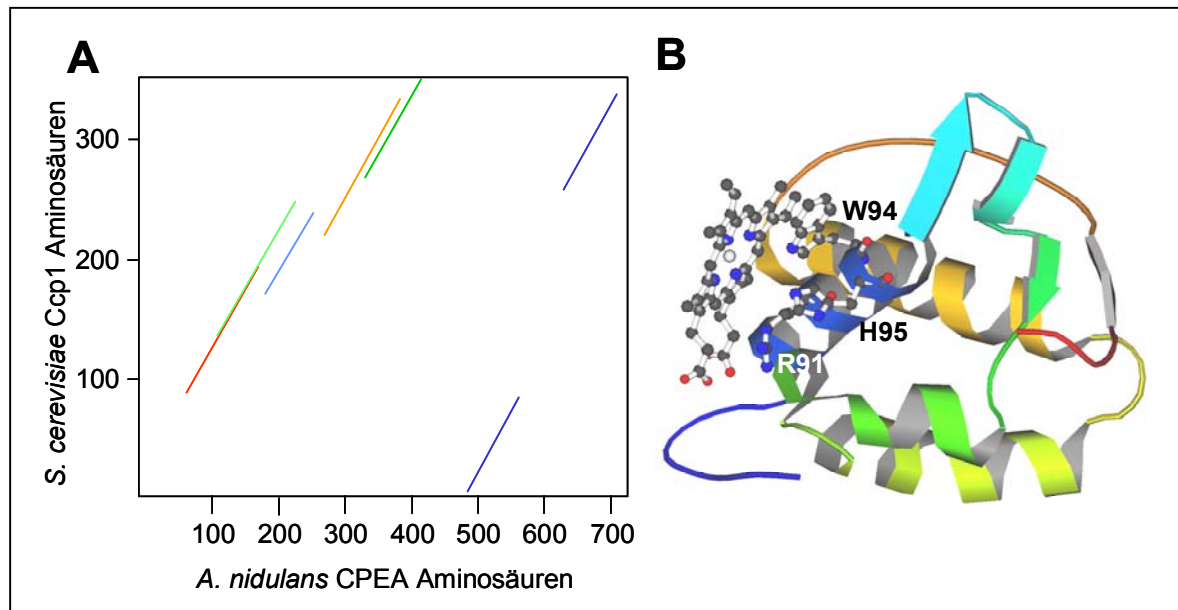


Abb. 6: (A) Punkt-Matrix-Vergleich von CPEA und der Cytochrom-c-Peroxidase (Ccp1) aus *Saccharomyces cerevisiae*. Die Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm MEGALIGN aus dem Sequenzanalyse Software Paket Dnastar mit einer Stringenz von 20 und einem Fenster von 83 durchgeführt. (B) Strukturmodell von CPEA im Bereich der Aminosäuren 76 -182. Das Modell wurde mit dem Programm SWISS-MODEL (<http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html>) in einer vergleichenden Strukturanalyse mit Hilfe der Ccp1-Struktur als Matritze berechnet. Aus der Struktur von Ccp1 ist lediglich die prosthetische Gruppe gezeigt. Die hochkonservierten Reste R91, W94 und H95 des katalytischen Zentrums sind mit Seitenketten dargestellt.

SWISS-MODEL (<http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html>) erstellt, wobei die experimentell aufgeklärte Struktur von Ccp1 aus *S. cerevisiae* als Matritze diente (Finzel et al. 1984). Dieses Modell zeigt eine große Übereinstimmung der Tertiärstrukturen beider Proteine, insbesondere im Bereich des aktiven Zentrums und in der Anordnung der Aminosäuren Arg-Trp-His des aktiven Zentrums zur prosthetischen Gruppe (Abb. 6B).

1.3 Reinigung von CPEA

CPEA wurde ursprünglich als Laccase beschrieben (Hermann et al. 1983) und auch das gereinigte Protein zeigte charakteristische katalytische Merkmale von Phenoloxidasen, wie es Laccasen sind (Scherer and Fischer 1998). Da die Sequenz von CPEA Homologie zu Katalase-Peroxidasen besitzt, für die eine Oxidase-Aktivität bisher nicht beschrieben ist, sollte diese besondere Eigenschaft des Enzyms überprüft werden. In einer erneuten Reinigung von CPEA wurde der Stamm SMS1, der während der sexuellen Entwicklung nur eine Phenoloxidase-Aktivität aufweist (Scherer and Fischer 1998), 72 h auf Agaroberflächen in Dunkelheit kultiviert, bis sich eine dichte Lage von Hülle-Zellen gebildet hatte. CPEA wurde durch folgende Verfahren ca. 570 x angereichert: Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel, hydrophobe Chromatographie an Phenylsepharose, Kationenaustauschchromatographie an SP-Sephacel und Anionenaustauschchromatographie

an Mono Q. Die Aktivität des Enzyms wurde im Verlaufe der Reinigung mit einem Phenoloxidase Test verfolgt. Es konnte auf allen Reinigungsstufen jeweils nur eine Phenoloxidaseaktivität in den eluierten Fraktionen nachgewiesen werden. Die Auftrennung der gereinigten Fraktion in einem denaturierenden Polyacrylamidgel zeigte, daß ein ca. 60 kDa großes Protein angereichert worden war, und nicht wie in vorausgegangenen Reinigungen ein 80 kDa großes Protein (Abb. 7A). Dies könnte bedeuten, daß CPEA prozessiert wird, wie es auch für CPEB aus *S. reticuli* beschrieben wurde. Dieses Enzym liegt über einen Zeitraum von 24 Stunden nach seiner Induktion als Homodimer, bestehend aus 82 kDa Untereinheiten des vollständigen Peptides vor. Nach verlängerter Inkubationszeit wurde hingegen ein Homotetramer aus C-terminal prozessierten, ca. 60 kDa großen CPEB Untereinheiten identifiziert (Zou and Schrempf 2000).

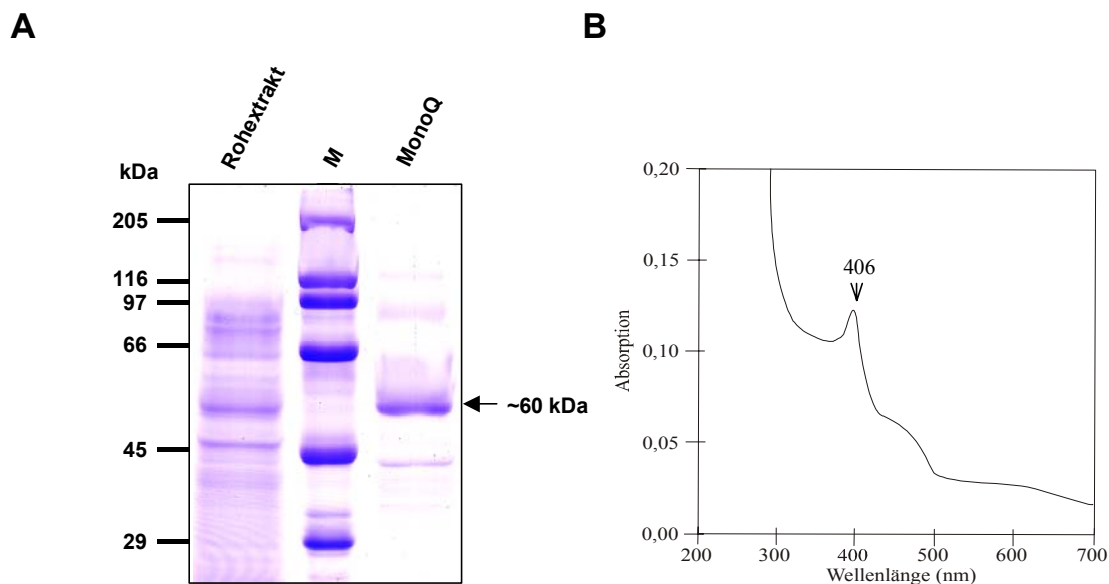


Abb. 7: (A) Analyse von partiell gereinigtem CPEA mittels SDS/PAGE. Es wurden 7 µg einer Mono Q-Fraktion aufgetrennt, die linke Spur zeigt den Rohextrakt der Reinigung. (B) UV-Vis Spektrum von CPEA. Das Spektrum wurde mit einer Enzympräparation ermittelt, die aus der in Scherer et al. 1998 beschriebenen Reinigung stammte und zeigt ein für Katalase-Peroxidasen charakteristisches Absorptionsmaximum bei 406 nm.

1.4 Lokalisierung von CPEA *in vivo*

Um zu untersuchen, ob CPEA spezifisch in Zellen des entstehenden Kleistotheziums gebildet wird, und um die subzelluläre Lokalisierung des Proteins aufzuklären, wurde eine translationale Fusion mit dem Grün Fluoreszierenden Protein (GFP) hergestellt. Hierzu wurde *GFP* in eine *Cla*I-Restriktionsschnittstelle im offenen Leserahmen von *cpeA* gesetzt (Abb. 8).

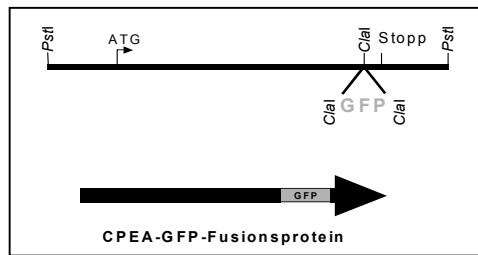


Abb. 8: Fusion von CPEA mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP). Die *GFP*-Sequenz wurde in eine *ClaI*-Restriktionsschnittstelle des offenen Leserahmens von *cpeA* eingefügt, so daß ein Hybridprotein aus GFP und CPEA translatiert wird.

Im Fusionsprotein war GFP 16 Aminosäuren vor dem C-terminalen Ende integriert. Das Fusionskonstrukt pMS42 wurde in den *A. nidulans* Wildtypstamm SMS8 transformiert. Von den in einer Southern-Blot Analyse untersuchten fluoreszierenden Transformanten wiesen zwei eine homologe Integration des Fusionskonstruktes im *cpeA*-Locus auf (Abb. 9). Einer dieser Stämme (SMS11) wurde für die Untersuchung ausgewählt, da die Expression des

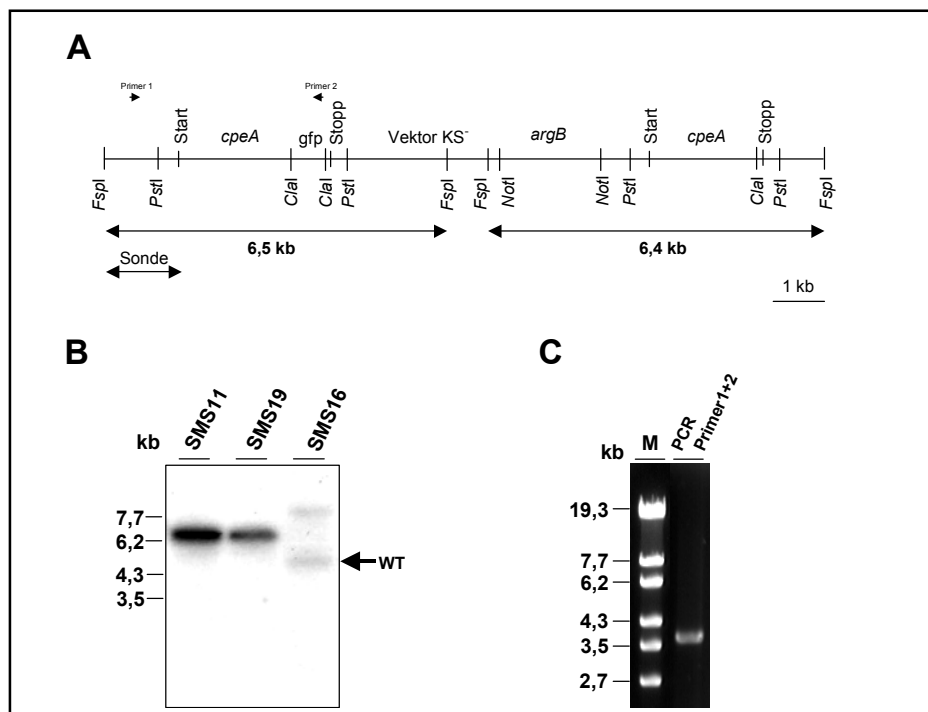


Abb. 9: Homologe Integration eines CPEA-GFP Fusionskonstruktes in den *cpeA* Locus. (A) Partielle Restriktionskarte des *cpeA* Genlocus nach der homologen Integration des zirkulären Fusionskonstruktes pMS42 in den Arginin-auxotrophen Wildtypstamm SMS8. Die Rekombination erfolgte stromaufwärts des in eine *ClaI*-Restriktionsschnittstelle klonierten *GFP*. Das vollständige Plasmid mit dem Selektionsmarker *argB* wurde in den *cpeA* Locus integriert (B) Die homologe Integration des Fusionskonstruktes wurde durch eine Southern-Blot Analyse verifiziert. Genomische DNA der Transformanten SMS11, SMS16 und SMS19 wurde mit dem Restriktionsenzym *FspI* geschnitten, in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die Hybridisierung erfolgte mit einer Sonde, die an den Bereich stromaufwärts des *cpeA*-Startkodons bindet. Die Sonde detektierte in SMS11 und SMS19 ein ca. 6,5 kb großes Fragment, da durch die homologe Integration zwei etwa gleich große *FspI*-Fragmente entstehen, die in der Elektrophorese nicht getrennt werden konnten. In SMS16 wurden ein für die Wildtypsituation erwartetes 4,7 kb Fragment, sowie ein weiteres durch ektopische Integration von pMS42 erzeugtes Fragment nachgewiesen. (C) Die homologe Integration von pMS42 wurde zusätzlich mittels PCR bestätigt. Genomische DNA von SMS11 diente als Matrize in einer PCR-Reaktion mit dem *GFP*-spezifischen Primer 2 und dem Primer 1, der außerhalb des in pMS42 enthaltenen Sequenzabschnitts bindet. Das ca. 3,9 kb große PCR-Fragment kann nur im Falle einer homologen Integration von pMS42 in den *cpeA* Locus amplifiziert werden.

Hybridproteins hier unter der Kontrolle des vollständigen Wildtyp-Promotors steht. Es konnte somit ausgeschlossen werden, daß durch im Fusionskonstrukt fehlende bzw. durch eine zufällige ektopische Integration im Genom hinzukommende regulatorische Elemente ein verändertes zeitliches oder räumliches Expressionsmuster erzeugt wurde.

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Kolonien des Stammes SMS11 zeigte, daß CPEA-GFP mit Beginn der sexuellen Entwicklung nach etwa 40 h Inokulation in Hülle-Zellen gebildet wurde. Im weiteren Verlauf der Fruchtkörperentwicklung war Fluoreszenz auch in Primordien zu beobachten, jedoch deutlich schwächer als in Hülle-Zellen, wo sie bis zum Abschluß der Kleistothezienbildung erhalten blieb (Abb. 10). Es konnte keine Fluoreszenz in vegetativem Myzel und in Konidiophoren beobachtet werden, so daß die Expression des Fusionsproteins in Übereinstimmung mit der gefundenen Lokalisierung von Laccase II-Aktivität war (Hermann et al. 1983). CPEA-GFP wurde im Zytoplasma der Hülle-Zellen lokalisiert. In der Mehrzahl der analysierten Hülle-Zellen wies das Fusionsprotein eine gleichförmige Verteilung auf. Häufig wurde jedoch auch das Auftreten intensiver fluoreszierender Bereiche unterschiedlicher Größe und Anzahl in den Hülle-Zellen beobachtet (Abb. 10G). Ob es sich hierbei um Zellkompartimente handelt, konnte nicht aufgeklärt werden. Da sowohl Katalasen, als auch Peroxidasen mit einer peroxisomalen Lokalisierung beschrieben sind, wurde die CPEA-Sequenz mit Hilfe des Programmes PSORT II (<http://psort.nibb.ac.jp/cgi-bin/runpsort.pl>) auf mögliche peroxisomale Lokalisierungsmotive hin untersucht. Diese konnten nicht identifiziert werden.

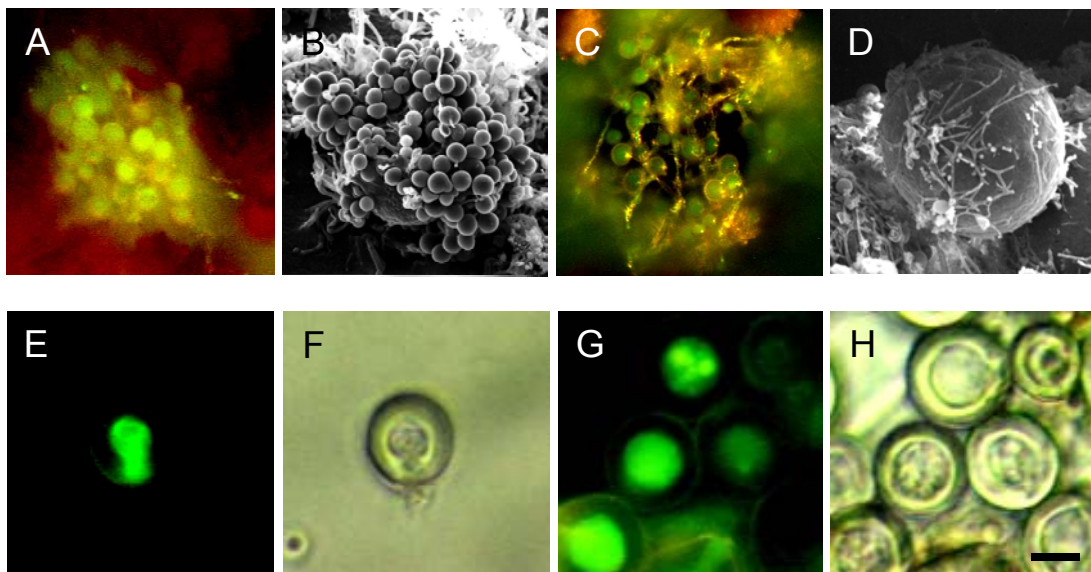


Abb. 10: Lokalisierung eines CPEA-GFP Fusionsproteins *in vivo*. (A, C) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Kleistothezien des Stammes SMS11 in 20-facher Vergrößerung. (A) Junges, dicht von Hülle-Zellen umgebenes Kleistothezium nach 72 h Inkubation. (C) Älteres Kleistothezium nach 120 h Inkubation. (B, D) Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen eines jungen Kleistotheziums mit Hülle-Zellen (B) und eines ausgereiften Kleistotheziums (D). (E-H) Aufnahmen von Hülle-Zellen des Stammes SMS11 in 40-facher Vergrößerung. (E, G) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. (F, H) Phasenkontrastaufnahmen der identischen Zellen. Der Größenbalken entspricht 40 μm in A-C, 50 μm in D, 10 μm in E-H.

1.5 Analyse der Expression von *cpeA*

1.5.1 Expression von *cpeA* in der Entwicklung

Langfristiges Ziel der Analyse von *cpeA* war die Identifikation eines transkriptionellen Regulators mit einer Funktion in der Kleistothezienentwicklung von *A. nidulans*. Aus den vorgestellten Arbeiten war jedoch lediglich bekannt, daß enzymatische Aktivität von CPEA (Laccase II) ausschließlich während der sexuellen Entwicklung zu detektieren war, und diese in Hülle-Zellen sowie Primordien lokalisierte (Hermann et al. 1983; Scherer and Fischer 1998). Dies wurde durch die oben beschriebene Lokalisierung eines CPEA-GFP Fusionsproteins bestätigt. Es sollte nun gezeigt werden, ob auch auf transkriptioneller Ebene eine differentielle Expression von *cpeA* vorliegt. Hierzu wurde eine Northern-Blot Analyse mit entwicklungsabhängiger RNA durchgeführt. Konidiosporen des Wildtypstammes FGSCA4 wurden auf Agarplatten inokuliert und zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung Myzel zur Präparation von Gesamt-RNA geerntet. Während der ersten 16 h wuchs das Myzel rein vegetativ. Die anschließende Entwicklung der asexuellen Sporenträger war nach etwa 30 h abgeschlossen. Nach ca. 40 h Inokulation waren in der mikroskopischen Kontrolle erste Hülle-Zellen sichtbar. Die Fruchtkörperbildung erstreckte sich über einen Zeitraum von 120 h bis zur Ausbildung reifer Ascosporen. Das *cpeA*-Transkript konnte ausschließlich im Zeitraum der sexuellen Entwicklung detektiert werden. Im vegetativen und asexuellen Abschnitt des Entwicklungszyklus, sowie nach Vollendung der Kleistothezienbildung war kein Transkript nachzuweisen (Abb. 11A). Der Expressionsverlauf war somit im Einklang mit dem Auftreten enzymatischer Aktivität.

Limitierung von Nährstoffen, vor allem von C-, und N-Quellen, ist bekannt als wichtiger Faktor in der Induktion der Fruchtkörperentwicklung von *A. nidulans*, so daß Hunger und die damit verbundenen Veränderungen in der Genexpression eng mit der sexuellen Entwicklung verknüpft sind (Zonneveld 1977). Es war aus diesem Grund zu klären, ob die Regulation der *cpeA*-Expression tatsächlich in direktem Zusammenhang mit der Kleistothezienbildung steht, oder eher durch Hunger und andere die Entwicklung begleitende Stressfaktoren bedingt wird. Deshalb wurde die Expression unter Bedingungen, die zwar Nährstofflimitierung, nicht aber die Induktion sexueller Entwicklung hervorrufen, untersucht. Eine Möglichkeit hierzu war die Verringerung der Glukosekonzentration im Medium. Auf Medien mit 0,8 % Glukose als einziger Kohlenstoffquelle anstelle von 2 % in den sonst verwendeten Standardmedien ist das

vegetative Wachstum und die asexuelle Entwicklung von *A. nidulans* unbeeinträchtigt, wohingegen die Fruchtkörperbildung nicht initiiert wird (Zonneveld 1972a). *cpeA* zeigt unter diesen Bedingungen lediglich eine sehr schwache Expression nach 24 h Inokulation, die nur durch verlängerte Belichtung der Autoradiographie sichtbar gemacht werden konnte (Abb. 11B).

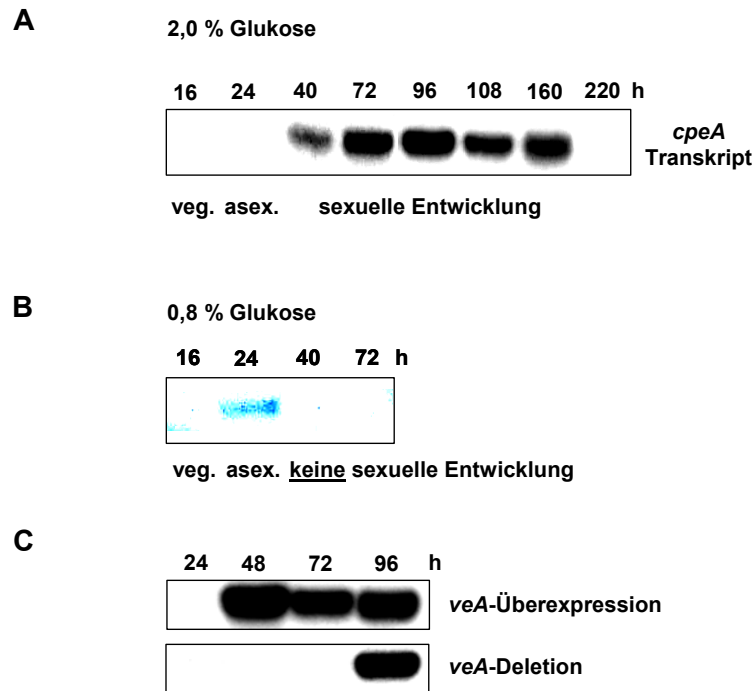


Abb. 11: Expression von *cpeA* in verschiedenen Entwicklungsstadien von *A. nidulans*. Konidiosporen des Wildtypstammes FGSC4 wurden auf Agarplatten (MM+2,0 bzw. 0,8 % Glukose) bei 37°C inokuliert und zur Isolierung von Gesamt-RNA Myzel verschiedener Entwicklungsstadien geerntet: vegetatives Wachstum (16 h), asexuelle Entwicklung (24 h), sexuelle Entwicklung (40-160 h), sowie nach vollendeter Fruchtkörperbildung (220 h). Bei Wachstum auf 0,8 % Glukose bildet *A. nidulans* keine Kleistothezien, wohingegen vegetatives Wachstum und asexuelle Konidiophorbildung nicht eingeschränkt sind. Je 10 µg RNA wurden in Northern-Blot Experimenten mit radioaktiv markierter *cpeA*-DNA hybridisiert und das *cpeA*-Transkript mittels Autoradiographie detektiert.

Eine weitere Möglichkeit bestand in der Untersuchung von *A. nidulans* Mutanten, die nicht in der Lage sind, Kleistothezien zu entwickeln. In einer dieser Mutanten ist das *veA*-Gen, das für einen Transkriptionsregulator kodiert, partiell deletiert. *veA*-Mutantenstämme zeigen vegetative Wachstumsraten und asexuelle Entwicklung wie der Wildtyp, ihnen fehlen aber sowohl Hülle-Zellen als auch Fruchtkörper. Wird *veA* hingegen unter Kontrolle des durch Nitrat induzierbaren *niiA*-Promotors überexprimiert, so werden Kleistothezien in erhöhter Anzahl im Vergleich zum Wildtyp gebildet, wobei der zeitliche Ablauf der sexuellen Entwicklung unverändert bleibt. Es wurde die Expression von *cpeA* in den Stämmen DVAR1 (ΔveA) und OVAR5 (*niiA*(p)::*veA*) (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von K.-S. Chae, Chonju, Korea) verglichen. Dabei zeigte sich keine signifikante Änderung des

Expressionsprofils gegenüber der Wildtypsituation durch Überexpression von *veA*, woraus geschlossen werden kann, daß VEA Expression nicht hinreichend ist für eine Aktivierung von *cpeA*. In der Deletionsmutante war die Expression um ca. 48 h verspätet zu beobachten, hatte aber zum Zeitpunkt 96 h ein vergleichbar hohes Niveau erreicht (Abb. 11C), obwohl keine Fruchtkörperbildung in der Kolonie zu erkennen war. Zusammengefasst zeigten die Ergebnisse eine deutliche Korrelation der Transkription von *cpeA* mit der sexuellen Entwicklung. Die hohe Expression in der *veA*-Deletionsmutante wies jedoch darauf hin, daß neben einer entwicklungsabhängigen Regulation noch weitere Aktivierungsmechanismen bestehen könnten.

1.5.2 Expression von *cpeA* unter Stressbedingungen

Obwohl die zelluläre Funktion der in der Literatur beschriebenen Katalase-Peroxidasen bislang unbekannt ist, ließ sich aufgrund der katalytischen Eigenschaften der Enzyme eine Rolle in der Bekämpfung von oxidativem Stress vermuten. Es wurde daher untersucht, ob oxidativer, oder andere Arten von Stress eine transkriptionelle Aktivierung von *cpeA* bewirken. Hierzu wurden Konidiosporen eines Wildtypstammes 20 h in Flüssigkultur mit Minimalmedium inokuliert und das Myzel anschließend in acht Aliquots aufgeteilt, die für weitere drei Stunden unter verschiedenen stressinduzierenden Bedingungen inkubiert wurden. Die untersuchten Stressarten waren oxidativer Stress, verursacht durch Zusatz von 0,5 mM H₂O₂, osmotischer Stress unter Zugabe von 1 M Sorbitol bzw. 1 M NaCl, Hunger durch Inokulation in Medium ohne jegliche Stickstoff-, oder Kohlenstoffquelle, bzw. durch Verwendung von Ethanol anstelle von Glukose als einziger C-Quelle, sowie Hitzestress, hervorgerufen durch Inkubation bei 42°C. Als Kontrolle diente Myzel, das in frisches Minimalmedium überführt wurde. Je 10 µg der aus den Myzelien gewonnenen Gesamt-RNA wurden einer Northern-Blot Analyse unterzogen. Zum Vergleich der Expression von *cpeA* unter den genannten Bedingungen mit der entwicklungsabhängigen Expression wurde 40 h Entwicklungs-RNA verwendet.

Es zeigte sich eine starke Induktion der Transkription in Abwesenheit jeglicher Kohlenstoffquelle, aber auch eine deutliche Zunahme bei Austausch der von *A. nidulans* bevorzugt genutzten C-Quelle Glukose gegen Ethanol. Ein zentrales Regulationselement in der Verwertung von C-Quellen ist die Katabolitrepression, die verhindert, daß Kohlenstoff- und Energiequellen, deren Abbau mit einer geringen Energieausbeute verbunden ist, in

Anwesenheit einer leicht verwertbaren Energiequelle genutzt werden. Unter beiden der oben genannten Bedingungen wird die durch den Regulator CREA vermittelte Katabolitrepression aufgehoben. Aufgrund der hier beobachteten transkriptionellen Induktion läßt sich vermuten, daß zumindest ein Teil der sechs im Promotorbereich von *cpeA* gefundenen putativen CREA-Bindestellen funktionell ist. Unter Stickstoffmangelbedingungen wurde das Transkript schwach detektiert und eine Analyse der Expression in zeitlicher Auflösung ergab, daß eine transiente Aktivierung vorliegt, die nach zweistündiger Induktion ein Maximum erreicht (Ergebnis nicht dargestellt). Diese könnte auf eine Aktivierung durch den GATA-Faktor AREA zurückzuführen sein, dessen Konsensus-Bindesequenz HGATAR viermal in einem Abschnitt von 500 bp stromaufwärts des *cpeA*-Startkodons gefunden wurde. AREA induziert

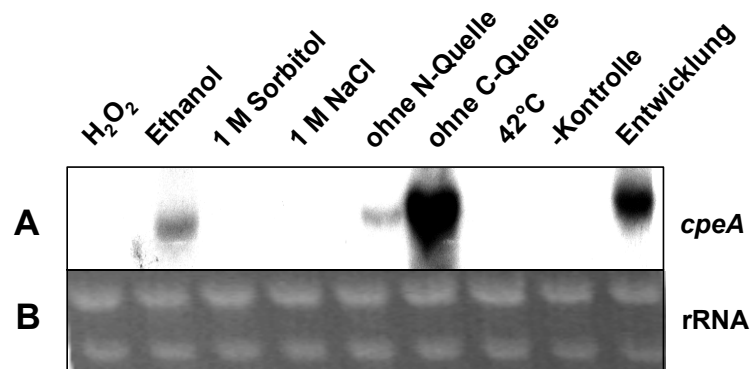


Abb. 12: Northern-Blot Analyse von *cpeA* unter Stressbedingungen. (A) Sporen des Wildtypstammes FGSCA4 wurden 20 h in Flüssig-MM inokuliert. Anschließend wurde das Myzel abfiltriert, mit den jeweiligen stressinduzierenden Medien gewaschen und für weitere 3 h in diesen inokuliert. Es wurde der Einfluß von oxidativem (0,5 mM H₂O₂), osmotischem (1 M Sorbitol bzw. NaCl), Hitze- (42°C), und Hungerstress (ohne C bzw. N-Quelle, 4 % Ethanol) auf die Expression von *cpeA* untersucht. Als Negativkontrolle wurde Myzel in frisches MM überführt, als Positivkontrolle diente 40 h-Entwicklungs-RNA. Je 10 µg Gesamt-RNA wurden aufgetragen. (B) Je 2 µg der jeweiligen RNA wurden als Ladekontrolle in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

Gene für die Nutzung alternativer Stickstoffquellen unter Mangelbedingungen. Weder unter oxidativem, osmotischem, sowie Hitzestress war das *cpeA*-Transkript zu detektieren (Abb. 12).

1.5.3 Expression von *cpeA* bei Überexpression von *edrA* und *nsdD*

Da bereits einige Regulatoren mit einer Funktion in der Fruchtkörperentwicklung von *A. nidulans* und nahe verwandten Ascomyceten bekannt waren, wurde zunächst untersucht, ob einer dieser Regulatoren für die entwicklungspezifische Aktivierung von *cpeA* verantwortlich sein könnte.

In Untersuchungen der Perithezienentwicklung des Ascomyceten *Sordaria macrospora* konnte gezeigt werden, daß die Mutation des C₆-Zink-Finger Transkriptionsfaktors PRO1 zu einem frühen Abbruch der Entwicklung führte (Masloff et al. 1999). Durch heterologe Hybridisierung genomischer DNA von *A. nidulans* mit einer *pro1*-Sonde konnte nachgewiesen werden, daß *A. nidulans* ein ähnliches Gen besitzt (S. Masloff, persönliche Mitteilung). Um dieses Gen zu identifizieren, wurde in der Datenbank des Genomsequenzierprojektes von Cereon Genomics LLC. (Cambridge, USA) eine Homologiesuche mit der PRO1-Sequenz durchgeführt. Es konnten zwei Sequenzen mit hoher Übereinstimmung gefunden werden. Die entsprechenden Gene wurden *edrA* und *edrB* (*early development regulator*) genannt. Die freundlicherweise zur Verfügung gestellte *edrA*-Sequenz enthält vermutlich den vollständigen offenen Leserahmen. Nach der Entfernung von drei Introns konnte ein Protein von 656 Aminosäuren abgeleitet werden, das eine Identität von

A

<i>S. macrospora</i>	PRO1	TOMHRRSRTGCTCRLRRKKCDEGSPMCTACKHLGLQCEYKRPMWWSNNDLRRKHKD
<i>A. nidulans</i>	EDRA	TKAYKRSRNGCYTCRLRRKKCDETHPNCVACTSLGVSCEYKRPSWWISTQARMLQKD
<i>A. nidulans</i>	EDRB	TKSHKRSRSGCETCRLRRKKCDEKHPSCGACNNLCVKCEYKRPVWWGNAEQRKMHKE

B

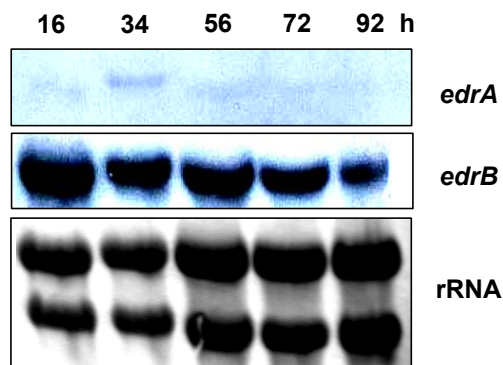


Abb. 13: Expression der *A. nidulans* Homologen *edrA* und *edrB* des *Sordaria macrospora* Transkriptionsfaktors *pro1*. (A) Vergleich der Aminosäuresequenzen des C₆-Zink-Finger DNA-Bindemotivs von EDRA, EDRB und PRO1. In allen Sequenzen identische Reste sind dunkelgrau, in zwei Sequenzen identische Reste hellgrau unterlegt. (B) Northern-Blot Analyse der Expression von *edrA* und *edrB* in der Entwicklung von *A. nidulans*. Es wurden je 15 µg Gesamt-RNA aufgetragen. Zur Kontrolle der RNA wurde die Nylonmembran vor der Hybridisierung mit Methylenblau gefärbt.

38,1 % mit dem 689 Aminosäuren langen PRO1 aufweist, wobei die Konservierung im Bereich des Zink-Fingers besonders hoch ist (Abb. 13A). Die für EDRB kodierende Teilsequenz ist im C-terminalen Bereich unvollständig und umfaßt 514 Aminosäuren.

Die Analyse der asexuellen Sporenentwicklung von *A. nidulans* führte zur Identifikation einer Kaskade von differentiell exprimierten Regulatoren, die wiederum für die differentielle Expression ihrer Zielgene verantwortlich sind (Timberlake 1991).

Um einen Hinweis auf eine mögliche Funktion von EDRA oder EDRB in der Kleistothezienentwicklung zu bekommen, wurde deshalb untersucht, ob diese ein entwicklungspezifisches Expressionsmuster aufweisen. Hierzu wurde eine Northern-Blot Analyse mit entwicklungsabhängiger RNA durchgeführt. Das ca. 2,8 kb große Transkript von *edrA* konnte 34 h nach Beginn der Inokulation verstärkt detektiert werden. Dieser Zeitpunkt entsprach der Einleitung der sexuellen Entwicklung, so daß *edrA* eine Funktion in einer sehr frühen Phase der Fruchtkörperbildung haben könnte. Für das ebenfalls ca. 2,8 kb große *edrB*-Transkript konnte keine differentielle Expression nachgewiesen werden (Abb. 13B).

Eine gute Möglichkeit, Informationen über die Funktion eines Gens zu erhalten, ist die Analyse der durch Deletion oder Überexpression des Gens verursachten phänotypischen Veränderungen. Da die Deletion von Genen aufgrund einer niedrigen Rekombinationsfrequenz in *A. nidulans* oft langwierig ist, wurde die Überexpression von *edrA* zur Analyse seiner Funktion gewählt. Der offene Leserahmen von *edrA* wurde mit dem Promotor des Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase Gens *gpdA* aus *A. nidulans* fusioniert, um eine starke konstitutive Expression von *edrA* zu erzeugen. Das Fusionskonstrukt pMS51 wurde in den Wildtypstamm RMSO11 transformiert. Ein großer Anteil der erhaltenen Transformanten zeigte einen identischen Phänotyp, so daß als Ursache die Überexpression von *edrA* angenommen wurde. Die radiale Wachstumsrate der Kolonien war reduziert, die Dichte des watteartigen Myzels jedoch erhöht. Konidiophore wurden nur in sehr geringer Anzahl gebildet, Hülle-Zellen und Fruchtkörper konnten nicht gefunden werden. Für die weiteren Untersuchungen wurde der Stamm SMS24 ausgewählt (Abb. 14B).

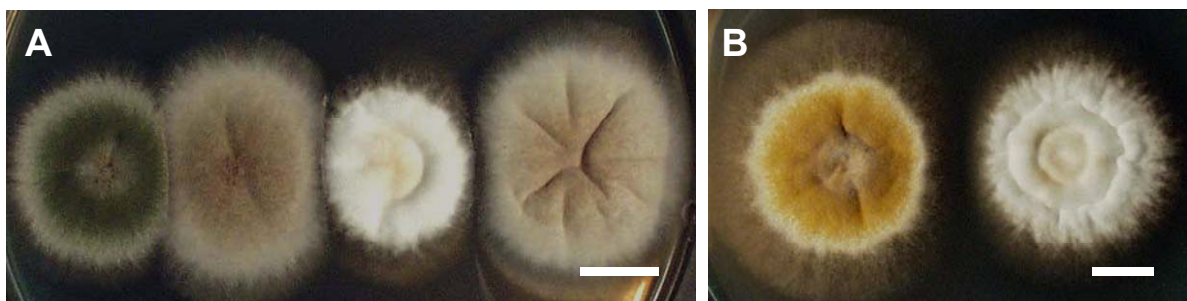


Abb. 14: Phänotypische Auswirkung der Überexpression der Transkriptionsfaktoren *nsdD* und *edrA*. (A) *nsdD* Überexpressionsstämmen im Vergleich zum Wildtyp (von links nach rechts: WT SRF200, SMS27, SMS25, SMS26). (B) *edrA* Überexpressionsstamm SMS24 im Vergleich zum Wildtyp SMS8 (links). Die Stämme wurden drei Tage auf Kompletmedium bei 37°C kultiviert. Der Größenbalken entspricht 1 cm.

Um zu untersuchen, ob die Überexpression von *edrA* Einfluß auf die Expression von *cpeA* hat, wurde eine Northern-Blot Analyse mit entwicklungsabhängiger RNA der Transformante SMS24 durchgeführt. Das *cpeA*-Transkript war im Vergleich zum Wildtyp erst 24 h später zu detektieren, dies läßt sich jedoch durch die geringere Wachstumsrate des Stammes erklären (Abb. 15). Es konnte demnach kein direkter Einfluß von EDRA auf die *cpeA*-Regulation gezeigt werden.

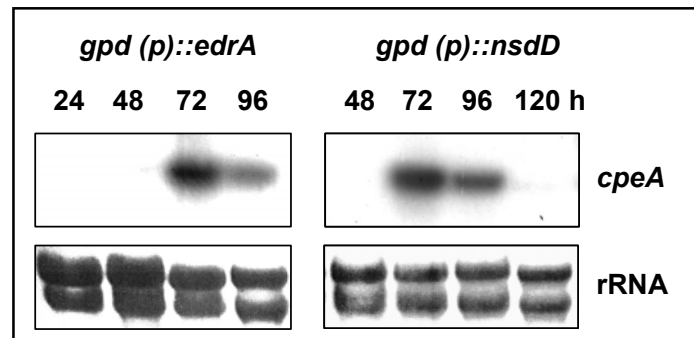


Abb. 15: Entwicklungsabhängige Expression von *cpeA* in einem *edrA*- und einem *nsdD*-Überexpressionsstamm. Die offenen Leserahmen der Transkriptionsfaktoren *edrA* bzw. *nsdD* wurden mit dem Promotor des Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase Gens *gpdA* fusioniert, um eine starke konstitutive Expression der Gene zu erhalten. Myzel der Transformanten SMS24 (*gpdA(p)::edrA*) und SMS25 (*gpdA(p)::nsdD*) wurde zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung zur Isolierung von Gesamt-RNA geerntet. Es wurden je 10 µg Gesamt-RNA in einem denaturierenden Agarosegel aufgetragen und auf eine Nylonmembran übertragen. Zur Kontrolle der RNA wurde die Membran vor der Hybridisierung mit einer [α^{32} -P]-dATP markierten *cpeA* spezifischen Sonde mit Methyleneblau angefärbt.

Durch Komplementation einer *nsd*-Mutante, die durch das vollständige Fehlen eines sexuellen Entwicklungszyklus charakterisiert ist, konnte gezeigt werden, daß die ursprüngliche Mutation in einem Gen lokalisiert war, das für einen GATA-Transkriptionsfaktor kodiert (Chae et al. 1995). Mit identischer Strategie wie oben beschrieben wurde überprüft, ob dieser für die Fruchtkörperbildung in *A. nidulans* essentielle Transkriptionsfaktor NSDD an der Regulation von *cpeA* beteiligt sein könnte. Ein Konstrukt mit der Fusion des *gpdA*-Promotors und dem kodierenden Bereich von *nsdD* (pMS19) wurde in den Wildtypstamm SRF200 transformiert. Ein signifikanter Anteil der isolierten Transformanten zeigte eine Reduktion der Anzahl asexueller Sporenträger bei vermehrter Bildung sexueller Fruchtkörper in verschieden starker Ausprägung. Es konnte zudem eine veränderte Pigmentierung der Konidiosporen beobachtet werden. Diese waren nicht intensiv grün gefärbt, sondern hatten eine gräuliche Färbung. In der Transformante SMS25 fehlten Konidiophore völlig (Abb. 14A). Allerdings wies SMS25 außerdem eine verringerte vegetative Wachstumsrate auf und bildete keine vollständig gereiften Kleistothezien. Da das Auftreten einer solchen Verschiebung im Verhältnis der beiden Entwicklungszyklen auch mit der Integration ansteigender Kopien von Wildtyp-*nsdD* in eine *nsdD*-Mutante beschrieben ist (Chae et al. 1995), wurden die

beobachteten Phänotypen auf eine erhöhte Transkription von *nsdD* zurückgeführt. Daraufhin wurde die Expression von *cpeA* in der Entwicklung der Transformante SMS25 untersucht. Die Expression von *cpeA* war auch hier ausschließlich während der Fruchtkörperbildung zu detektieren, die im Vergleich zum Wildtyp später induziert und nach ca. 120 h auf der Stufe unreifer Kleistothezien abgebrochen wurde (Abb. 15). Es konnte keine von der Fruchtkörperbildung unabhängige Aktivierung von *cpeA* unter *nsdD*-Überexpression gefunden werden. Ein Hinweis auf eine *nsdD*-abhängige Regulation von *cpeA* konnte somit nicht gefunden werden.

1.5.4 Expression von *cpeA* in Abhängigkeit von *stuA*

Eine Mutation im Gen des Transkriptionsfaktors *stuA* bewirkt eine veränderte Morphologie der Konidiophore, die hier verkürzt (stunted) sind. Es wurde gefunden, daß STUA die zeitliche und räumliche Expression der zentralen Regulatoren der asexuellen Entwicklung moduliert. Die bisher bekannten Zielgene werden negativ reguliert (Dutton et al. 1997). Neben der Funktion in der Konidiophorentwicklung hat *stuA* auch eine essentielle Funktion in der Kleistothezienbildung. Die *stuA1*-Mutante bildet weder Hülle-Zellen noch Fruchtkörper, Zielgene von STUA in der sexuellen Entwicklung wurden jedoch bislang nicht identifiziert. Es befinden sich zwei Konsensus-Bindestellen des Transkriptionsfaktors STUA ca. 1 kb stromaufwärts des putativen Transkriptionsstarts von *cpeA*. Im folgenden wurde untersucht, ob STUA an der Regulation von *cpeA* beteiligt ist. Da beide Konsensus-Bindestellen innerhalb des offenen Leserahmens des *Anp5cr* Gens liegen (Abb. 4), wurde ein möglicher Zusammenhang der Regulation der Gene überprüft. Hierzu wurde die Expression von *cpeA* und *Anp5cr* im Wildtyp und einer *stuA1*-Mutante mittels Northern-Blot analysiert. Die Induktion der Transkription von *cpeA* war in der *stuA1*-Mutante deutlich geringer als im Wildtyp, folgte aber dem gleichen zeitlichen Verlauf.

Die Expression von *Anp5cr* war in beiden Stämmen in der vegetativen Wachstumsphase und der asexuellen Entwicklung am höchsten. Im Wildtyp war auch in der frühen sexuellen Entwicklung eine stark abgeschwächte Expression detektierbar. Zu den späteren Entwicklungszeitpunkten konnte kein *Anp5cr*-Transkript nachgewiesen werden (Abb. 16). Die beiden Gene zeigten also einen gegenläufigen Transkriptionsverlauf und es besteht die Möglichkeit, daß sie in einer einzelnen Zelle nicht gleichzeitig abgelesen werden.

Es konnte somit gezeigt werden, daß eine Bindung von STUA im offenen Leserahmen von *Anp5cr* in der sexuellen Entwicklung nicht im Widerspruch zu dessen transkriptioneller Aktivität steht.

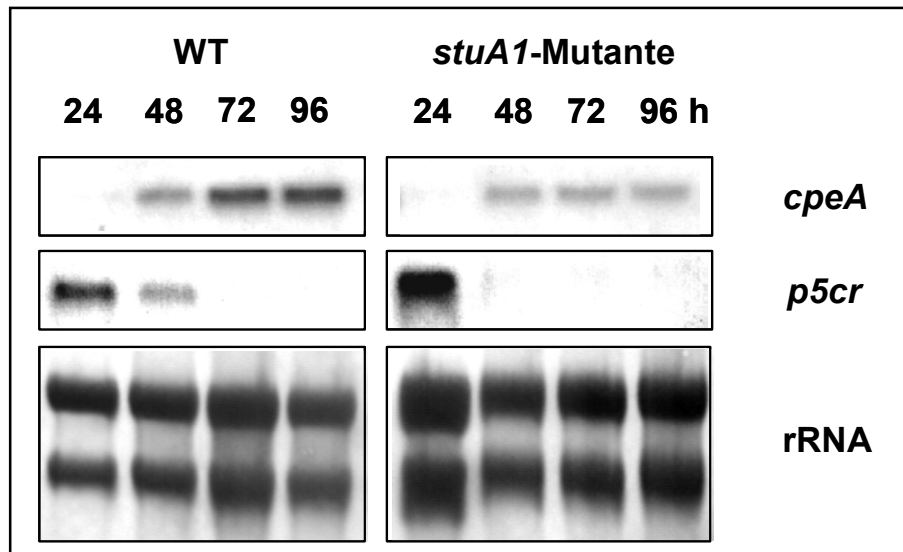


Abb. 16: Vergleich der entwicklungsabhängigen Expression von *cpeA* und *Anp5cr* im Wildtyp und in einer *stuA1* Mutante. Je 10 µg Gesamt-RNA der Entwicklungszeitpunkte 24, 48, 72 und 96 h wurden aufgetragen und mit einer radioaktiv markierten *cpeA*- bzw. *Anp5cr*-spezifischen Sonde hybridisiert. Die Größe der detektierten Transkripte betrug ca. 2,7 kb für *cpeA* und ca. 1,2 kb für *Anp5cr*. Zur Kontrolle der verwendeten RNA wurde diese auf der Nylonmembran mit Methylblau angefärbt. Es sind die Banden der 28 S und 18 S rRNA zu sehen.

Um weitere Hinweise auf eine Funktion von STUA als Regulator von *cpeA* erhalten zu können, wurde die Expression von *cpeA* in vegetativem Myzel unter Überexpression von *stuA* untersucht. Hierzu wurde der Stamm UI132 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von B. Miller, Moscow, USA) verwendet, der eine Integration einer Fusion des offenen Leserahmens von *stuA* mit dem induzierbaren Promotor des Alkohol-Dehydrogenase Gens *alcA* in den *argB* Locus trägt. Der *alcA*-Promotor wird durch Glukose reprimiert und durch Ethanol stark induziert. Als Kontrolle dienten die Stämme TPM1 und TTA292, die die asexuellen Transkriptionsfaktoren *abaA* bzw. *brlA* unter Kontrolle des *alcA*-Promotors exprimieren, sowie ein Wildtypstamm. Konidiosporen wurden 20 h mit Glukose als C-Quelle inokuliert und das Myzel anschließend in ein Medium mit Ethanol als einziger C-Quelle überführt. Die Induktion erfolgte über einen Zeitraum von drei Stunden. Da auch der *cpeA*-Promotor selbst durch Ethanol induzierbar war, war in den Kontrollen ebenfalls eine transkriptionelle Aktivierung von *cpeA* zu beobachten. Diese zeigte einen reproduzierbaren Ablauf, in dem es nach starker Induktion in der ersten Stunde zu einem deutlichen Rückgang in der zweiten Stunde und einem neuerlichen Ansteigen der Transkription nach drei Stunden kam. Unter Überexpression von STUA war hingegen eine gleichbleibend hohe Transkription

zu verzeichnen (Abb. 17). Dieses Ergebnis deutete darauf hin, daß STUA eine Funktion als Transkriptionsaktivator von *cpeA* besitzt.

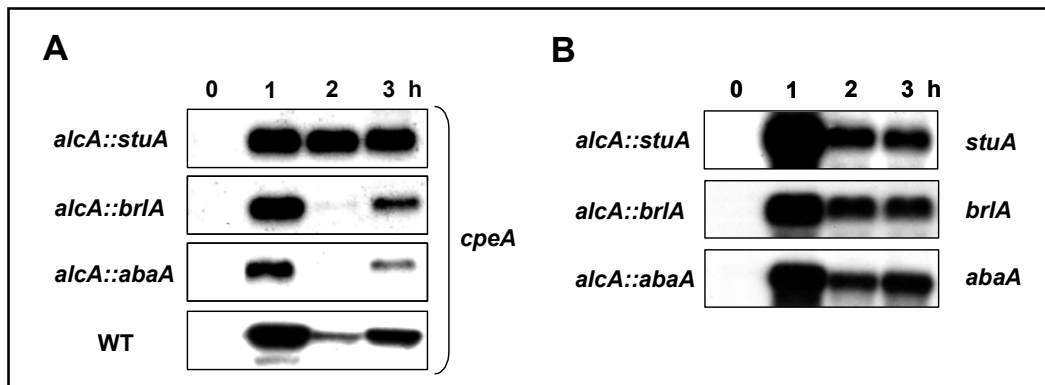


Abb. 17: Expression von *cpeA* in Abhängigkeit von der Expression bekannter Regulatoren der Entwicklung von *A. nidulans*. Es wurden Transformanten von *A. nidulans* untersucht, die eine Integration eines Fusionskonstruktes des offenen Leserahmens der Transkriptionsfaktoren *stuA*, *abaA* bzw. *brlA* mit dem Promotor des Alkohol-Dehydrogenase Genes (*alcA*) in den *argB* Locus aufweisen. Sporen wurden 20 h in Minimalmedium inokuliert und das Myzel anschließend in Minimalmedium mit Ethanol als einziger Kohlenstoffquelle überführt. Es wurde einmal unmittelbar vor, und während der dreistündigen Induzierung stündlich Myzel geerntet und daraus Gesamt-RNA isoliert. Es wurden je 10 µg RNA aufgetragen. Mit Ethanol als Kohlenstoffquelle kommt es auch im Wildtypstamm zu einer Induktion der *cpeA*-Transkription, die einen reproduzierbaren zeitlichen Verlauf aufweist: starker Anstieg innerhalb der ersten Stunde, drastischer Rückgang in der zweiten und erneuter Anstieg in der dritten Stunde. Unter Überexpression von *abaA* und *brlA* ist ein ähnlicher Verlauf zu beobachten, während *stuA*-Überexpression zu einer kontinuierlich hohen Expression von *cpeA* führt (A). Die Expression von *stuA*, *abaA* und *brlA* unter induzierenden Bedingungen ist in B gezeigt.

1.5.5 Deletionsanalyse der STUA-Bindestellen

Um zu überprüfen, ob die beobachtete STUA-abhängige Aktivierung von *cpeA* unmittelbar auf STUA zurückzuführen ist und die Konsensus-Bindestellen im *cpeA*-Promotor hierfür notwendig sind, wurden diese in Reporterkonstrukten deletiert. Das CPEA-GFP Fusionskonstrukt pMS18 wurde durch Anfügen PCR-amplifizierter Bereiche der Promotorregion verlängert. pMS40 enthält 1650 bp stromaufwärts des *cpeA*-Startkodons mit beiden putativen STUA-Bindestellen, pMS41 1065 bp mit einer Bindestelle und pMS42 1025 bp ohne Bindestelle (Abb. 18). Die Reporterkonstrukte wurden in den *A. nidulans* Wildtypstamm SMS8 transformiert. Je 16 Transformanten pro Konstrukt wurden in einer Southern-Blot Analyse untersucht. Für die Expressionsanalysen wurden daraus je zwei Transformanten ausgewählt, die nur eine ektopische Integration des Plasmids aufwiesen. Diese Stämme wurden anschließend mittels PCR auf vollständige Integration der Promotorbereiche hin überprüft, und bestätigt, daß die Integration nicht durch homologe Rekombination mit dem *cpeA*-Locus entstanden war (Ergebnisse nicht dargestellt). In diesem Fall würde das Fusionsprotein unter Kontrolle des vollständigen Wildtyp-Promotors

exprimiert werden. Die auf diese Weise kontrollierten Stämme SMS12 und 13 (zwei Bindestellen), SMS14 und 15 (eine Bindestelle), sowie SMS16 und 17 (keine Bindestelle) zeigten keine phänotypischen Anomalien, Kleistothezien wurden in gleicher Anzahl und Zeit gebildet.

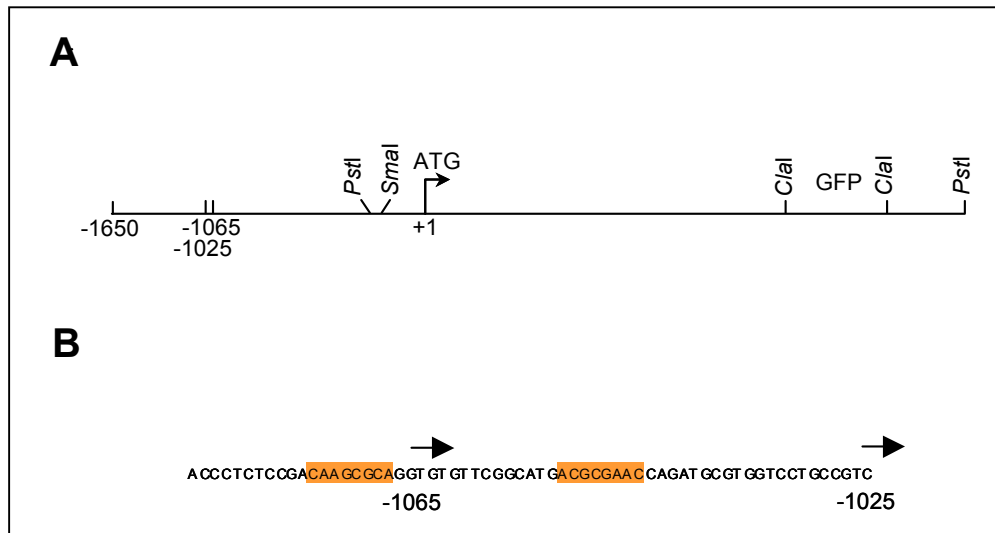


Abb. 18: Konstrukte zur Analyse der *in vivo* Funktionalität von putativen STUA-Bindestellen stromaufwärts von *cpeA*. (A) Das auf dem *PstI*-Subklon pMS16 basierende *cpeA-GFP* Fusionskonstrukt (pMS18) wurde durch Anfügen von PCR-amplifizierten Fragmenten genomischer DNA bis zu den Positionen -1650 (pMS40; zwei STUA-Bindestellen), -1065 (pMS41; eine STUA-Bindestelle), bzw. -1025 (pMS42; keine STUA-Bindestelle), bezogen auf das *cpeA*-Startcodon, verlängert. (B) Sequenzausschnitt -1085 bis -1024. Die beiden möglichen STUA-Bindestellen sind grau unterlegt, Pfeile markieren den Anfang des *cpeA*-Promotorbereichs in pMS41 bzw. pMS42.

In einer Northern-Blot Analyse wurde nun die Expression des Hybridtranskripts in der Entwicklung und in gehungertem vegetativem Myzel untersucht. Hierfür wurde eine radioaktiv markierte *GFP*-Sonde verwendet. Die Expression in SMS12, 13, 14 und 15 zeigte keine signifikanten Unterschiede. Das *cpeA-GFP* Transkript war in der vegetativen und asexuellen Phase sich auf Agaroberflächen entwickelnder Kolonien, sowie in nicht gehungerten Flüssigkulturen nicht nachweisbar. In der frühen sexuellen Entwicklung nach 72 h Inokulation erreichte die Expression ihre maximale Stärke. Auch durch eine fünfstündige Hungerinduktion wurde in vegetativen Myzel eine starke Zunahme der Transkription beobachtet. In den Transformanten SMS16 und 17, in denen beide STUA-Bindestellen im Reporterkonstrukt fehlen, wurde eine deutlich verringerte transkriptionelle Aktivierung in der Kleistothezienentwicklung gefunden, wohingegen die Hungerinduktion nicht beeinflusst war (Abb. 19). Aus diesen Resultaten kann gefolgert werden, daß STUA maßgeblich an der entwicklungsabhängigen Transkriptionsaktivierung von *cpeA* beteiligt ist, die

hungerinduzierte Aktivierung jedoch STUA-unabhängig ist. Für die Bindung von STUA scheint das Vorhandensein einer Bindestelle ausreichend zu sein.

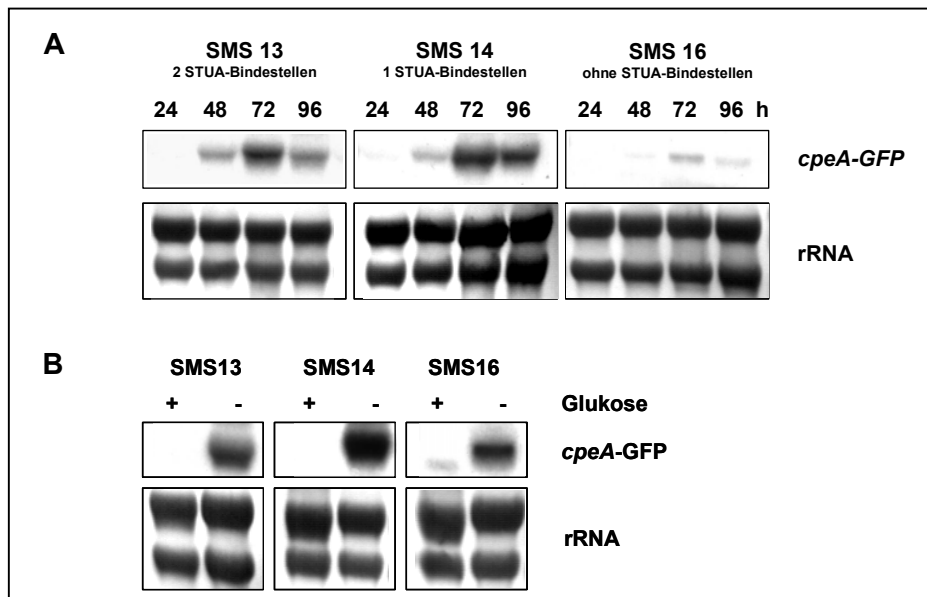


Abb. 19: Expression des *cpeA-GFP* Hybridtranskriptes in den *A. nidulans* Transformanten SMS13, SMS14 und SMS16. Die Transformanten tragen je eine ektopische Integration der Konstrukte pMS40 (SMS13; zwei STUA-Bindestellen), pMS41 (SMS14; eine STUA-Bindestelle), bzw. pMS42 (SMS16; keine STUA-Bindestelle). Zur Untersuchung der entwicklungsabhängigen Expression (**A**) des *cpeA-GFP* Transkripts wurde Myzel zu verschiedenen Zeitpunkten nach Inokulation von Agarplatten entnommen und Gesamt-RNA isoliert. Zur Analyse der hungerabhängigen Expression (**B**) wurde Myzel nach 20 h Wachstum in Minimalmedium mit Glukose in glukosefreies Medium transferiert und 5 h inkubiert. Es wurden je Spur 10 µg RNA mit einer *GFP*-spezifischen radioaktiv markierten Sonde hybridisiert. Zur Kontrolle der geladenen RNA wurde die Membran mit Methylenblau angefärbt.

Da vermutet wird, daß STUA die Expression seiner Zielgene in der asexuellen Entwicklung in einer Zelltyp-spezifischen Weise reguliert (Miller et al. 1992), wurde überprüft, ob dies auch für die Regulation von *cpeA* zutreffen könnte. Hierzu wurde die Expression des CPEA-GFP Fusionsproteins *in vivo* untersucht. Wie aufgrund der Ergebnisse der Northern-Blot Analyse erwartet, war die zu beobachtende Fluoreszenz in Kolonien von SMS16 während der Kleistothezientwicklung deutlich geringer als bei SMS13 und SMS14 (Abb. 20A-C). Die Untersuchung von gequetschten jungen Fruchtkörpern zeigte, daß dies hauptsächlich auf eine stark verringerte Expression in Hülle-Zellen zurückzuführen war. In dikaryotischem Myzel aus den Kleistothezien war hingegen eine vergleichbare Fluoreszenzintensität zu beobachten (Abb. 20D-G). Dies könnte bedeuten, daß die Transkriptionsaktivierung von *cpeA* durch STUA spezifisch für Hülle-Zellen ist.

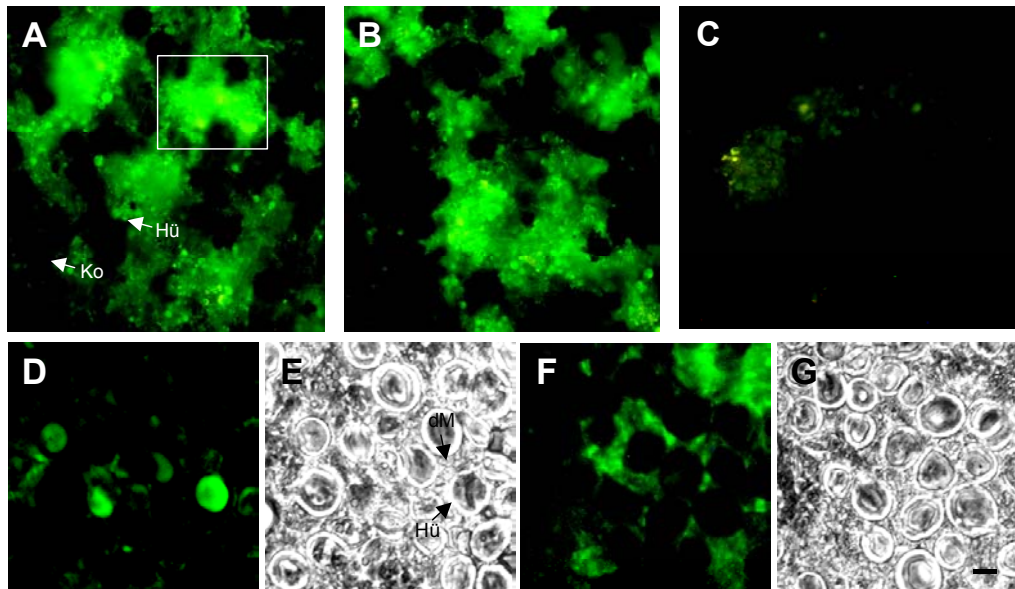


Abb. 20: *In vivo* Untersuchung der Expression des CPEA-GFP Fusionsproteins unter Kontrolle von Promotoren mit zwei (SMS13), einer (SMS14), bzw. keiner (SMS16) putativen STUA-Bindestelle. (A-C) Kolonien der Transformanten SMS13 (A), SMS14 (B) und SMS16 (C) nach 72 h Wachstum in zehnfacher Vergrößerung unter Epifluoreszenzbedingungen. Die Belichtungszeit betrug jeweils 0,8 s. Ein junges Kleistothezium, dicht umgeben von Hülle-Zellen (Hü) ist in A umrahmt dargestellt. Die vollständig ausdifferenzierten Konidiophore (Ko) zeigen keine Fluoreszenz. (D-G) Quetschpräparate junger Kleistothezien der Stämme SMS14 (D, E) und SMS16 (F, G) in 40-facher Vergrößerung unter Epifluoreszenz- (D, F) bzw. Phasenkontrastbedingungen (E, G). Die Belichtungszeit war 2 s in D und 4 s in F. Expression des CPEA-GFP Fusionsproteins im Zytoplasma der Hülle-Zellen war nur bei SMS14, nicht aber bei SMS16 zu beobachten, wohingegen in beiden fluoreszierendes dikaryotisches Myzel (dM) erkennbar war. Der Größenbalken entspricht 50 μ m (A-C), bzw. 10 μ m (D-G).

1.6 Nachweis des CPEA-GFP Fusionsproteins *in vitro*

Beim Versuch, das CPEA-GFP Fusionsprotein fluoreszenzmikroskopisch auch in gehungerten Keimlingen nachzuweisen, hatte sich gezeigt, daß drei und sechs Stunden nach Beginn der Hungerinduktion keine Fluoreszenz in den Hyphen zu beobachten war, obwohl unter identischen Bedingungen eine hohe Transkription des Gens gefunden wurde. Eine Expression des Fusionsproteins war erst nach mindestens zehn Stunden Inokulation ohne Kohlenstoffquelle zu erkennen. Um diese Beobachtung zu überprüfen, wurde eine Western-Blot Analyse durchgeführt. Es wurden Proteinrohextrakte aus dem gleichen Myzel gewonnen, das auch zur RNA-Präparation für die oben beschriebene Northern-Blot Analyse verwendet worden war. Je 40 μ g Protein wurden auf einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Der Nachweis des Fusionsproteins erfolgte mit einem anti-GFP-Antikörper. In entwicklungsabhängigen Extrakten der Stämme SMS13 und SMS14 konnte das Protein nach 72 und 96 h nachgewiesen werden. Nach 96 h Inokulation war sowohl in Extrakten von SMS13, als auch in solchen von SMS14 ein ca. 30-35 kDa großes Protein zu detektieren. Da die translationale Fusion von CPEA mit GFP am C-Terminus durchgeführt wurde, könnte es sich um ein C-terminales Spaltprodukt von CPEA

handeln und damit auf eine Prozessierung des Proteins hinweisen. Zum Zeitpunkt 48 h war kein Protein zu detektieren, obwohl mit identischem Material ein Signal im Northern-Blot erhalten wurde, das allerdings deutlich schwächer war als nach 72 und 96 h. Die Ursache hierfür lag vermutlich in der geringeren Sensibilität der Western-Blot Analyse. Wie schon aufgrund der stark reduzierten Fluoreszenz in Kolonien des Stammes SMS16 zu erwarten, konnte hier kein Fusionsprotein nachgewiesen werden. Zudem konnte aber auch in keinem der drei Stämme nach einer fünfstündigen Hungerinduktion ein Signal im Western-Blot erhalten werden, obwohl in der Northern-Blot Analyse gezeigt wurde, daß vergleichbare Mengen des Transkripts wie in der Fruchtkörperentwicklung vorhanden waren (Abb. 21). Dies bestätigte die Beobachtung fehlender Fluoreszenz in den gehungerten Keimlingen und ist ein Hinweis auf eine mögliche translationale Kontrolle der Expression von CPEA.

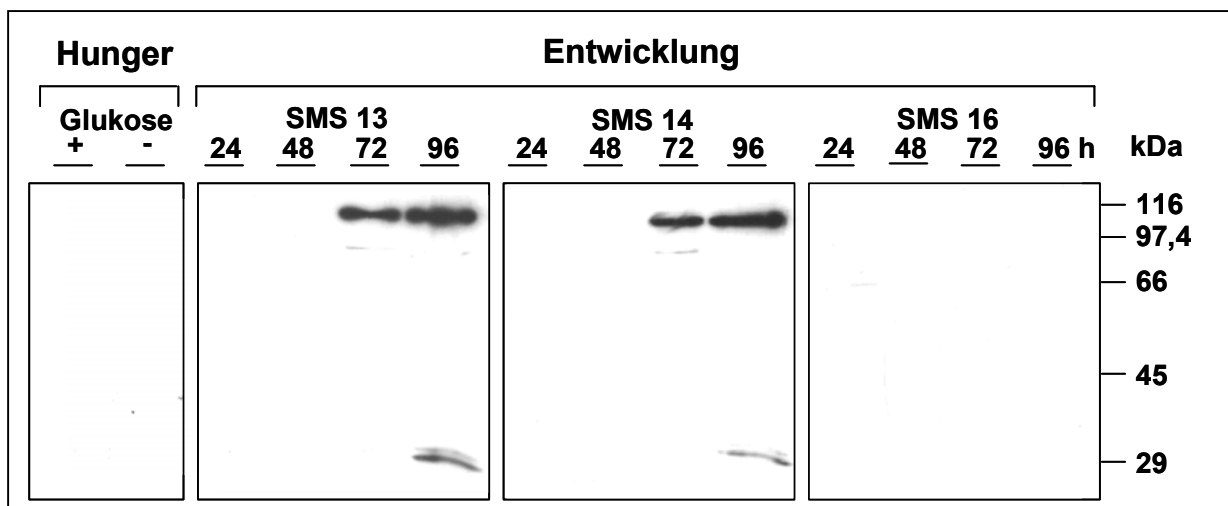


Abb. 21: Western-Blot Analyse der Expression des CPEA-GFP Fusionsproteins in der *A. nidulans* Entwicklung und unter Hungerbedingungen. Es wurden je 40 µg Proteinrohextrakt von 24, 48, 72 und 96 h entwicklungsinduziertem Myzel, sowie von 5 h hungerinduziertem Myzel in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der Nachweis des CPEA-GFP Fusionsproteins erfolgte mittels monoklonalem anti-GFP-Antikörper und einem gegen diesen gerichteten Peroxidase-konjugierten Zweitantikörper, der durch Chemilumineszenz detektiert wurde. In hungerinduzierten Proteinextrakten der untersuchten Stämme SMS13, 14 und 16, sowie in entwicklungsabhängigen Extrakten von SMS16 konnte auch durch verlängerte Exposition der Autoradiographie kein CPEA-GFP Fusionsprotein nachgewiesen werden.

2. Herstellung und Analyse einer subtraktiven cDNA-Bank

Zur Identifizierung einer größeren Anzahl spezifisch in der Kleistothezientwicklung von *A. nidulans* exprimierter Gene wurde eine subtraktive cDNA-Bank hergestellt. Hierfür wurde die Methode der suppressiven subtraktiven Hybridisierung (SSH) gewählt (Diatchenko et al. 1996). Das Funktionsprinzip der SSH ist in Abb. 22 dargestellt. Ziel war die Anreicherung von differentiell in der Fruchtkörperentwicklung exprimierten cDNA-Klonen. Es wurde eine cDNA-Population vegetativer Hyphen und asexueller Konidiophore (Driver) von einer cDNA-Population, die zusätzlich Transkripte der sexuellen Entwicklung repräsentierte (Tester), subtrahiert. Daneben sollte mit der SSH auch eine Angleichung der Häufigkeit der differentiellen cDNAs erreicht werden, so daß stark und schwach exprimierte Gene in der subtraktiven Bank gleichermaßen vertreten sein sollten.

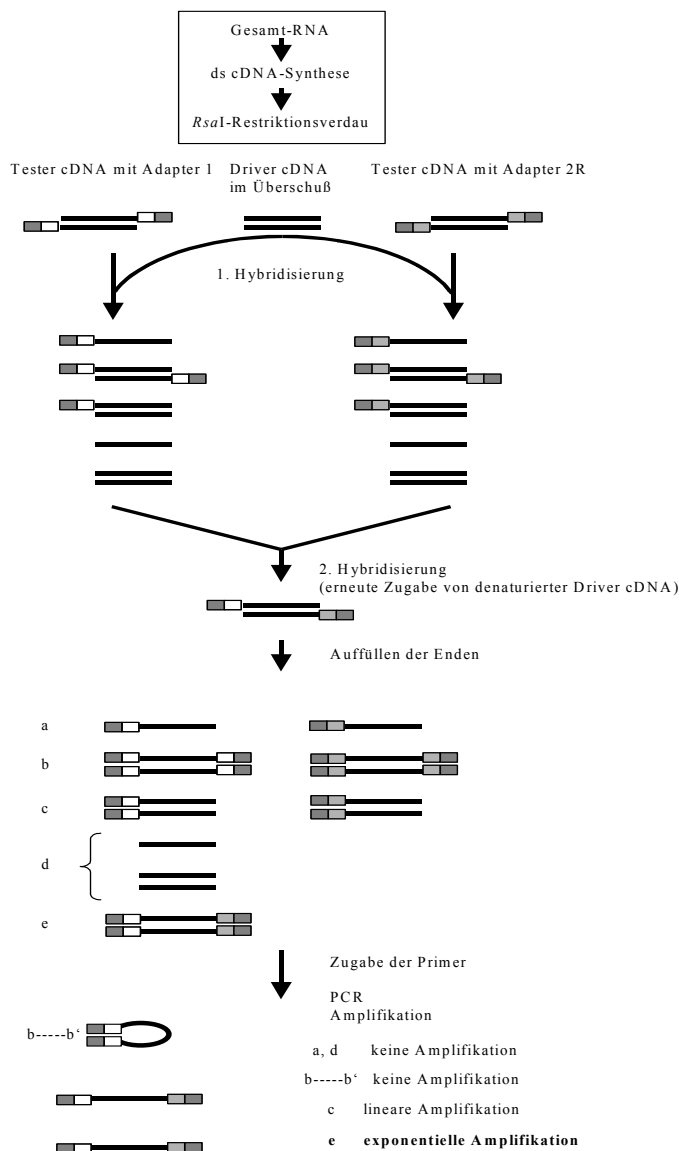


Abb. 22: Funktionsprinzip der suppressiven subtraktiven Hybridisierung (SSH). Die SSH ermöglicht die Anreicherung von cDNAs, die spezifisch in einer sogenannten Tester-, aber nicht bzw. deutlich reduziert in einer anderen, der sogenannten Driver cDNA Population vorkommen. Die ds cDNA von Driver und Tester wird mit dem Restriktionsenzym *RsaI*, das die Basenfolge GTAC erkennt, geschnitten. Nur die Tester cDNA Fragmente werden nachfolgend in getrennten Ansätzen mit unterschiedlichen Adaptern ligiert, und in zwei aufeinanderfolgenden Hybridisierungen mit einem Überschuß an Driver cDNA inkubiert. Zwischen den Hybridisierungen wird die cDNA nicht denaturiert. In den nachfolgenden PCR Reaktionen werden nur solche cDNA Fragmente exponentiell amplifiziert, die unterschiedliche Adapterenden besitzen. Dadurch soll einerseits eine effektive Subtraktion von nicht differentiell exprimierter cDNA erreicht werden, andererseits auch eine Angleichung in der Häufigkeit differentiell exprimierter cDNA (Suppression) stattfinden. Die Suppression beruht darauf, daß in großer Anzahl vorhandene cDNA Fragmente mit höherer Wahrscheinlichkeit bereits in der ersten Hybridisierung einen Bindungspartner finden. Schema verändert nach Diatchenko et al. 1996.

2.1 Herstellung einer SSH-cDNA-Bank

Für die Synthese der Tester cDNA wurde der Wildtypstamm FGSCA4 verwendet, für die der Driver cDNA eine *medA26*-Mutante. Die *medA26*-Mutante bildet Hülle-Zellen, die Kleistothezienentwicklung wird jedoch nicht initiiert. Konidiosporen beider Stämme wurden 20 h in Flüssigkultur angezogen, das entwicklungs kompetente Myzel anschließend auf Filter übertragen und zur Induktion der asexuellen und sexuellen Entwicklung auf Agarplatten inkubiert. Nach 22 h war in beiden Stämmen die Bildung der Konidiophore abgeschlossen. Nach 60 h wurden im Wildtypstamm vollständig ausdifferenzierte Kleistothezien mit reifen Ascosporen gefunden. Zu sieben Zeitpunkten wurde Myzel geerntet. Um zu vermeiden, daß durch Nährstoffmangel und andere Stressbedingungen ausgelöste differentielle Expression, die nicht mit der Fruchtkörperbildung verknüpft ist, in der subtraktiven Bank repräsentiert wird, wurde auch von der Mutante Myzel der späten Zeitpunkte geerntet. Aliquots des Myzels der verschiedenen Entwicklungsstufen wurden für die Isolation von Gesamt-RNA zusammengeführt. Je 1 µg RNA wurde für die cDNA-Synthese eingesetzt.

Die nach der subtraktiven Hybridisierung erhaltenen cDNA-Fragmente von ca. 100 -1000 bp Länge wurden PCR-amplifiziert und in den TOPO 2.1-Vektor kloniert. 930 der erhaltenen Klone wurden in Mikrotiterplatten überführt.

2.2 Verifizierung der Subtraktionseffizienz

Es wurde überprüft, ob die subtraktiven cDNAs der erhaltenen Klone in der eingesetzten Tester cDNA häufiger vorkommen als in der Driver cDNA, und somit eine Anreicherung differentieller cDNAs erreicht wurde. Hierzu wurde eine South-Northern-Blot Analyse mit 96 subtraktiven cDNAs durchgeführt. Die cDNA-Fragmente wurden PCR-amplifiziert, als Duplikate in 2 %igen Agarosegelen aufgetrennt und auf Nylonmembrane übertragen. Diese wurden in identische Hälften geteilt und mit [α -³²P]-dCTP markierter Tester-, bzw. Driver-cDNA gleicher Aktivität hybridisiert. Für 31 der untersuchten cDNAs konnten keine Signale in der Autoradiographie erhalten werden. Von den übrigen 65 zeigten 42 (65 %) deutlich stärkere Signale mit der Tester-cDNA Sonde, 21 (32 %) etwa gleiche mit Tester- und Driver-cDNA. Lediglich zwei Fragmente wurden besser mit der Driver-cDNA Sonde detektiert (Abb. 23). Daraus wurde geschlossen, daß die Subtraktion funktioniert hatte und spezifisch in der Tester-cDNA vorkommende Fragmente gut angereichert wurden. Damit war die cDNA-Bank für die weitere Analyse geeignet.

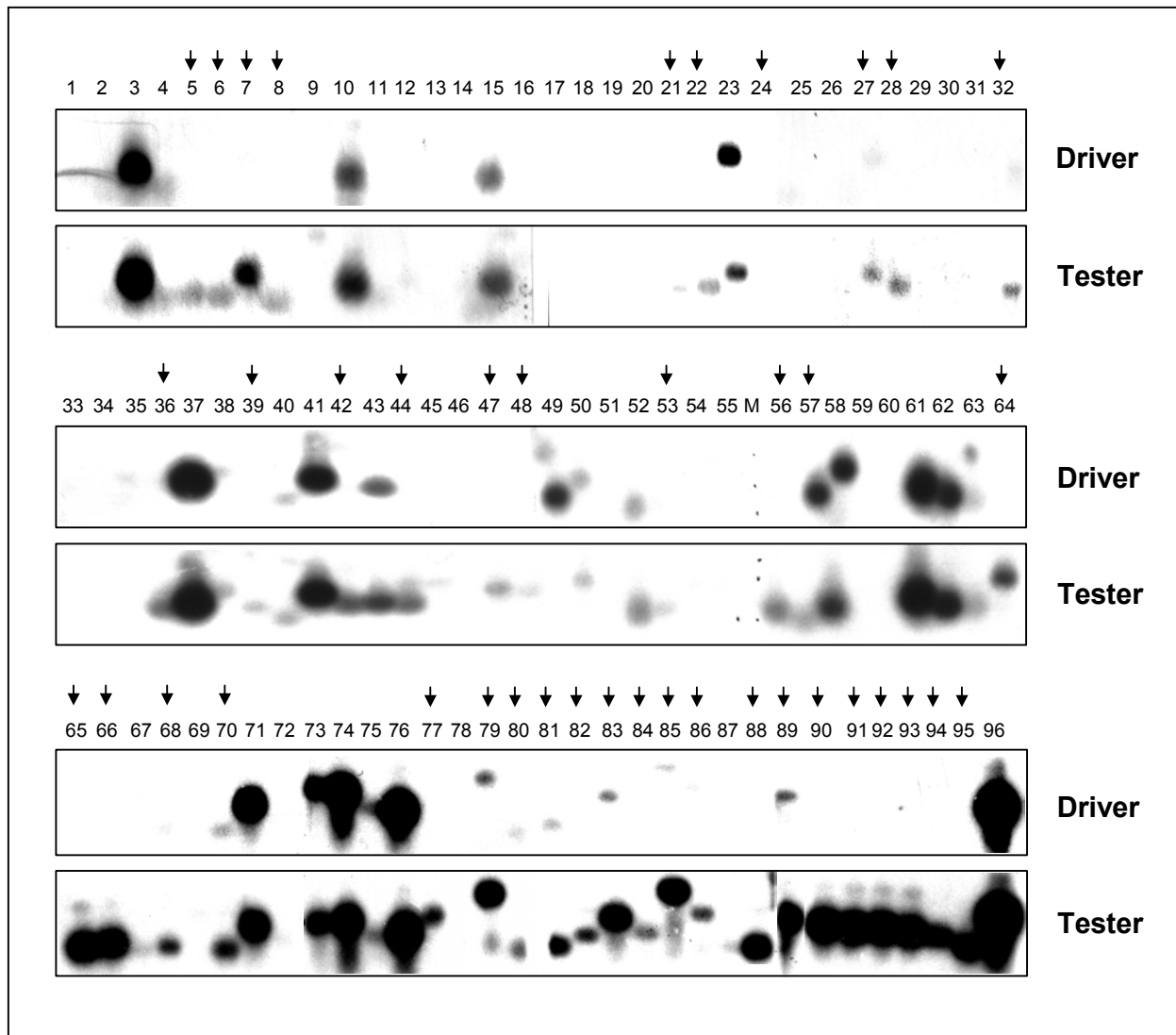


Abb. 23: Identifizierung differentiell exprimierter Klone einer subtraktiven cDNA-Bank. Die cDNA Fragmente der Klone M3a1- c8 (1-32), M3d1-f8 (33-64) und M1a1-c12 (ohne b3/10; c4/9)(65-96) wurden PCR-amplifiziert, als Duplikate in einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Aliquots der für die Subtraktion verwendeten Driver- und Tester-cDNA wurden radioaktiv markiert und mit je einem Duplikat der geblotteten PCR-Produkte hybridisiert. Subtraktive cDNA-Fragmente, die in der Autoradiographie deutlich stärkere Signale mit der Tester-, als mit der Driver-cDNA ergaben, sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.

2.3 Sequenzierung von SSH-Klonen

Vor der Sequenzierung wurde die Größe der inserierten cDNA-Fragmente überprüft, und solche Klone, deren Fragmente eine Länge von mindestens 250 bp hatten, ausgewählt. Es wurden 81 verschiedene Sequenzabschnitte ermittelt. Diese wurden mit Hilfe des bBLASTx Programms (<http://www.ch.embnet.org/software/bBLAST.html?>) mit einer nicht redundanten Proteindatenbank verglichen. Die gefundenen Homologien sind in Tab. 13 zusammengefaßt. Fünf der Teilsequenzen waren identisch mit in Datenbanken hinterlegten *A. nidulans* Proteinsequenzen.

Klon	Seq.länge (bp)	Homologie Zugriffs-Nr.	Beschreibung	Identische AS (%) / Länge
A1a2	389	AF102701	Cytochrom c Oxidase UE I	28/64
A1a7	563	Z81039	C25D7.2 Protein [<i>Caenorhabditis elegans</i>]	30/70
A1a8	230	keine		
A1a10	547	AF000381	nicht funktionelles Folat-Bindeprotein [<i>Homo sapiens</i>]	42/198
A1a12	373	AF066073	SP 85 Protein der Sporenhülle [<i>Dictyostelium discoideum</i>]	37/45
A1b1	431	AE004700	hypothetisches Protein PA2722 [<i>Pseudomonas aeruginosa</i>]	38/52
A1b3	519	AK024463	FLJ00056 Protein [<i>Homo sapiens</i>]	27/79
A1b6	275	AF271878	Polyprotein [Hepatitis C Virus]	55/27
A1c3	294	keine		
A1c6	613	AF217760	QDE2 Gen-Silencing [<i>Neurospora crassa</i>]	52/148
A1c7	343	O13396	MSH2 DNA-Reparaturprotein [<i>Neurospora crassa</i>]	46/62
A1e3	434	AL110469	hypothetisches 69,5 kDa Protein [<i>Schizosaccharomyces pombe</i>]	43/41
A1e7	308	AL034558	hypothetisches MAL3P2.2 Protein [<i>Plasmodium falciparum</i>]	27/59
A1e9	325	O59932	Hexose-Transporter (hohe Affinität) [<i>Schizosaccharomyces pombe</i>]	46/49
A1e12	399	U78554	Mucin MUC5B [<i>Homo sapiens</i>]	37/74
A1f2	442	Q14669	TRIP12 Thyroid Rezeptor interagierendes Protein [<i>Homo sapiens</i>]	32/55
A2a7	359	keine		
A2a11	321	AAD44003	ATSC Oxyacyl Reduktase [<i>Agrobacterium tumefaciens</i>]	37/87
A2b1	572	AL023794	hypothetisches 85,9 kDa Protein [<i>Schizosaccharomyces pombe</i>]	26/100
A2b7	268	keine		
A2c3	358	P25618	hypothetisches 107,9 kDa Protein [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>]	47/84
A2d1	333	AK026677	FLJ23024 [<i>Homo sapiens</i>]	24/78
A2d8	342	P22151	GRG1 entwicklungsabhängig reguliertes Protein [<i>Neurospora crassa</i>]	50/69
A2e2	479	P40920	30 kDa Hitzeschock Protein [<i>Aspergillus nidulans</i>]	60/97
A2e8	634	P50085	hypothetisches 34,9 kDa Protein, Prohibitin-ähnlich [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>]	65/170
A2e11	506	Z81035	C15H11.4 Protein [<i>Caenorhabditis elegans</i>]	31/100
A2f11	359	AL391014	BIO A [<i>Streptomyces coelicolor</i>]	39/33
A2g2	577	P40920	30 kDa Hitzeschock Protein [<i>Aspergillus nidulans</i>]	100/97
A2g8	350	AF016419	F07G11.8 Protein [<i>Caenorhabditis elegans</i>]	37/45
A2g10	536	P32481	EIF2 Gamma UE Translationsinitiation [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>]	79/34
A2h2	236	U51272	1,3-Beta-D-Glucan Synthase [<i>Aspergillus nidulans</i>]	79/78
M1b11	510	P40920	30 kDa Hitzeschock Protein [<i>Aspergillus nidulans</i>]	57/92
M1c5	258	keine		
M1c10	596	AL121586	CEP250 Centrosom assoziiertes Protein [<i>Homo sapiens</i>]	70/102
M2a3	362	AAF27912	Mutanase [<i>Penicillium purporogenum</i>]	44/121
M2b8	281	Q40273	S2-RNase Inkompatibilitätsfaktor [<i>Malus domestica</i>]	33/56

Klon	Seq.länge (bp)	Homologie Zugriffs-Nr.	Beschreibung	Identische AS (%) / Länge
M2b10	357	O59730	Methionin-Aminopeptidase [<i>Schizosaccharomyces pombe</i>]	54/66
M2b12	308	O94549	hypothetisches serinreiches Protein [<i>Schizosaccharomyces pombe</i>]	37/64
M2c9	605	O04217	Extensin [<i>Bromheadia finlaysoniana</i>]	42/26
M2c10	307	AF239659	HEX1, Verschluß der Plasmamembran bei Läsionen [<i>Aspergillus nidulans</i>]	100/62
M2c11	400	JC4019	MSH3 DNA-Reparaturprotein [<i>Mus musculus</i>]	43/95
M2d10	328	Q44067	Alpha-Hämolyisin [<i>Aeromonas hydrophila</i>]	46/26
M3b9	406	P33219	hypothetisches 13,5 kDa Lipoprotein [<i>Escherichia coli</i>]	28/70
M3c2	265	Q41192	NAPRP3 prolinreiches Protein [<i>Nicotiana glauca</i>]	35/39
M3c4	297	keine		
M3c6	447	AF232903	Alkohol Oxidase P68, Affinität zu doppelsträngiger RNA [<i>Helminthosporium victoriae</i>]	89/101
M3d4	286	AL445066	putative Fumarat Reduktase UE [<i>Thermoplasma acidophilum</i>]	37/45
M3f1	252	AB005035	Aldolase [<i>Branchiostoma belcheri</i>]	30/63
M3f2	163	keine		
M4a1	364	X05404	Chymotrypsin Inhibitor 2 [<i>Hordeum vulgare</i>]	37/75
M4a4	313	keine		
M4a9	265	P12297	SU WA Protein [<i>Drosophila melanogaster</i>]	38/54
M4b3	296	keine		
M4b4	493	AJ405723	T-Zell Rezeptor Beta [<i>Homo sapiens</i>]	35/40
M4b5	273	O42711	VPS 29 Transport in Vakuolen [<i>Schizosaccharomyces pombe</i>]	54/46
M4c3	354	G69883	hypothetisches Protein ymaE [<i>Bacillus subtilis</i>]	38/103
M4c5	396	AF012091	cysteinreiches Protein [<i>Metarhizium anisopliae</i>]	66/68
M4c7	707	AF010288	Synaptobrevin, Vesikeltransport [<i>Aspergillus parasiticus</i>]	98/62
M4c8	318	keine		
M4d9	473	AF241171	hypothetisches Protein [<i>Pseudomonas aeruginosa</i>]	34/151
M4d12	409	P35441	Thrombospondin 1, adhesives Glykoprotein [<i>Mus musculus</i>]	25/70
M4f1	559	AF109315	spätes sexuelles Entwicklungsprotein [<i>Aspergillus nidulans</i>]	99/126
M5a3	320	U51030	Ydr275wp [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>]	30/52
M5a5	188	keine		
M5b8	655	P09805	Chitinase [<i>Kluyveromyces lactis</i>]	44/179
M5b12	341	keine		
M5c4	247	keine		
M5d2	250	Z81051	hypothetisches Protein C55A6.4 [<i>Caenorhabditis elegans</i>]	43/62
M5d8	624	AE003745	CG5902 Genprodukt [<i>Drosophila melanogaster</i>]	51/131
M5d10	312	AL389891	konserviertes hypothetisches Protein [<i>Neurospora crassa</i>]	59/44
M5e8	467	6320499	Ssd1p, Zellzykluskontrolle [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>]	41/34
M5e10	328	keine		
M5g1	342	Q47309	hypothetisches 20,1 kDa Protein [<i>Escherichia coli</i>]	38/42
M5g2	379	AE001069	Molybdopterin Oxidoreduktase [<i>Archaeoglobus fulgidus</i>]	39/38

Klon	Seq.länge (bp)	Homologie Zugriffs-Nr.	Beschreibung	Identische AS (%) / Länge
M5g7	424	Q00208	Alkalische Protease, hungerinduziert [<i>Aspergillus nidulans</i>]	100/140
M5h1	224	keine		
M5h5	584	AP001518	ABC-Transporter [<i>Bacillus halodurans</i>]	36/61
M6a11	450	AL035263	SPBC776.15C [<i>Schizosaccharomyces pombe</i>]	32/59
M6b3	481	keine		
M6b12	208	O08342	Cellulase [<i>Bacillus</i> sp. BP23]	42/26
M6d7	189	P00161	Cytochrom b [<i>Aspergillus nidulans</i>]	100/56

Tab. 13: Homologien sequenzierter SSH-Klone. Die Sequenzen wurden einer Homologiesuche mit dem bBLASTx Programm (<http://www.ch.embnet.org/software/bBLAST.html?>) unterzogen. Gesucht wurde in einer nicht redundanten Proteinsequenz-Datenbank mit den vom Programm vorgegebenen Parametern. Angegeben sind die Sequenzen mit der höchsten Übereinstimmung.

2.4 Northern-Blot Analyse eines SSH-Klones mit Ähnlichkeit zu Mutanasen

Der Klon M2a3 der subtraktiven cDNA-Bank wies Homologien zu pilzlichen Mutanasen (α -1,3-Glukanasen) auf. α -1,3-Glukan hat eine wichtige Funktion als Energiereserve in der Fruchtkörperentwicklung von *A. nidulans* und eine entwicklungspezifische α -1,3-Glukanase-Aktivität wurde nachgewiesen (Zonneveld 1972c). Es erschien daher wahrscheinlich, daß das für diese α -1,3-Glukanase kodierende Gen eine entwicklungspezifische Regulation aufweist. Deshalb wurde untersucht, ob der isolierte SSH-Klon mit der beschriebenen Mutanase korrespondiert.

Eine Northern-Blot Analyse mit entwicklungsabhängiger RNA zeigte, daß die α -1,3-Glukanase nur während der Kleistothezienentwicklung exprimiert wurde. Das Transkript wurde nach drei Tagen Inokulation nachgewiesen (Abb. 24). In der Literatur wird ein starker Anstieg von α -1,3-Glukanase-Aktivität in Rohextrakten von Entwicklungskulturen zwischen dem dritten und vierten Tag beschrieben (Zonneveld 1975). In einer dreistündigen Hungerinduktion von Hyphen konnte hingegen kein Transkript der Mutanase nachgewiesen werden (Ergebnis nicht dargestellt). Daraus wurde geschlossen, daß die in der cDNA-Bank identifizierte Mutanase eine Funktion in der Mobilisierung des Reservestoffes α -1,3-Glukan haben könnte.

Um diese Annahme zu überprüfen, wurde untersucht, ob die Verfügbarkeit zusätzlicher Energiequellen im Medium Einfluß auf den Zeitpunkt der transkriptionellen Aktivierung der Mutanase hat. Hierzu wurde das auf einer permeablen Membran gewachsene Myzel nach 24 h auf frisches Medium überführt. Unter diesen Bedingungen war die Expression der Mutanase erst nach 92 h zu detektieren. In einem weiteren Versuch wurde Glukose und zusätzlich

Ethanol als Energiequelle verwendet. Auch hier verschob sich die Expression der Mutanase um ca. 20 h. Als Indikator für den Zeitpunkt, an dem die Glukosekonzentration einen kritischen Wert unterschritt und die Erschließung alternativer Energiequellen initiiert wurde, wurde die Expression des Alkohol-Dehydrogenase Genes *alcA* verfolgt, das durch Glukose reprimiert und durch Ethanol aktiviert wird. Das *alcA*-Transkript konnte zum Zeitpunkt 72 h nachgewiesen werden (Abb. 24). Aus den Ergebnissen wurde gefolgert, daß die Aktivierung des Mutanasegenes erst nach der Verwertung externer Energiequellen erfolgt. Da auch eine zeitliche Verschiebung der α -1,3-Glukanase-Aktivität durch eine erhöhte Glukosekonzentration im Medium beobachtet wurde (Zonneveld 1972a), war dies ein weiterer Hinweis, daß die isolierte cDNA für diese differentiell exprimierte Mutanase kodiert.

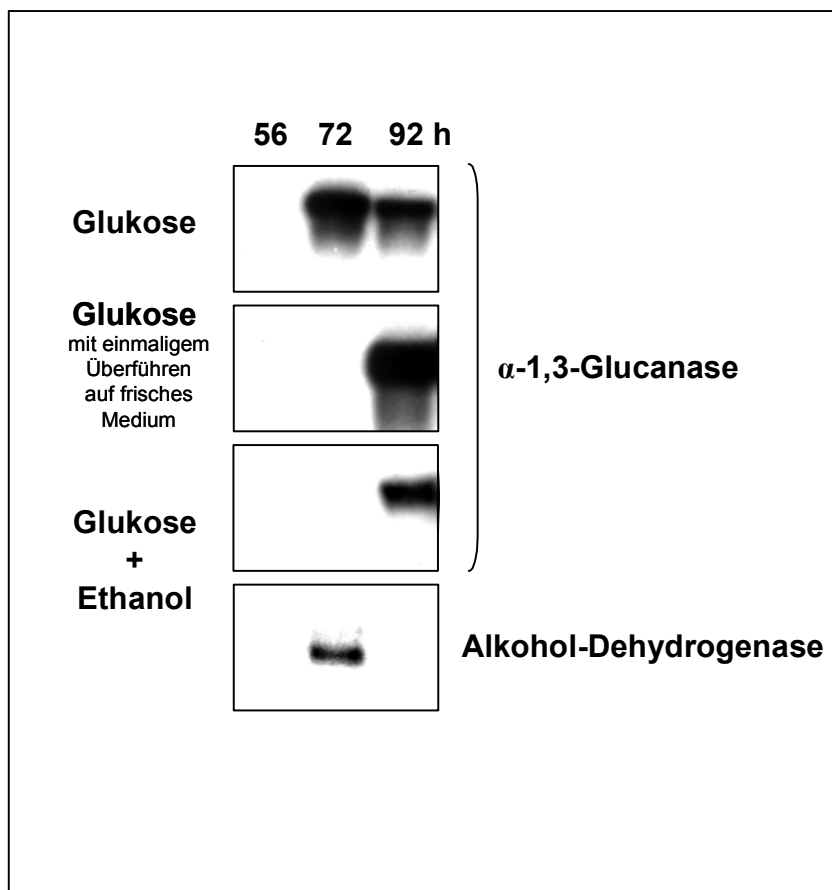


Abb. 24: Einfluß externer Kohlenstoffressourcen auf die Expression einer α -1,3-Glucanase während der Fruchtkörperbildung.

Konidiosporen eines Wildtypstammes wurden auf der Oberfläche einer permeablen Membran auf Agarmedien mit 2 % Glukose bzw. je 2 % Glukose und Ethanol inkubiert. In einem Fall wurde die bewachsene Membran nach 24 h auf frisches Medium überführt. Es wurden je Spur 15 μ g Gesamt-RNA aufgetrennt. Sowohl die zusätzliche Verfügbarkeit einer von *A. nidulans* bevorzugten (Glukose), als auch die einer alternativen C-Quelle (Ethanol) verursacht eine Verschiebung der Induktion der α -1,3-Glucanase Expression. Das Alkohol-Dehydrogenase-Gen *alcA* wird durch Glukose reprimiert und in Abwesenheit von Glukose durch Ethanol induziert.

V. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde das Katalase-Peroxidase Gen *cpeA* von *Aspergillus nidulans* molekular untersucht. *cpeA* codiert für eine 82 kDa große Katalase-Peroxidase und wird spezifisch während der Kleistothezienentwicklung exprimiert. Das Protein lokalisiert im Zytoplasma von Hülle-Zellen und dikaryotischem Myzel von reifenden Fruchtkörpern. Die Expression von *cpeA* wird in der sexuellen Entwicklung durch den entwicklungspezifischen Transkriptionsfaktor STUA reguliert, zudem wird das Gen entwicklungsunabhängig durch Glukose- und Nitratmangel aktiviert, das hungerinduzierte Transkript jedoch nicht translatiert.

Die Analyse einer subtraktiven cDNA-Bank von differentiell in der Fruchtkörperentwicklung exprimierten Genen offenbarte einen hohen Anteil von Sequenzen, die aufgrund der gefundenen Homologien mit Anpassungen an Stressbedingungen in Verbindung gebracht werden können.

Induktion der Katalase-Peroxidase: Hunger oder Entwicklung?

Die molekulare Analyse von *cpeA* hatte zum Ziel, durch die Aufklärung der Regulation dieses Gens im Rahmen der Kleistothezienentwicklung zu einem besseren Verständnis der Fruchtkörperbildung beizutragen. Die Untersuchungen zur transkriptionellen Steuerung von *cpeA* zeigten, daß im Besonderen durch Glukosemangel eine starke Induktion bewirkt wird. Es stellte sich also die Frage, ob dem beobachteten entwicklungspezifischen Auftreten der Enzymaktivität (Hermann et al. 1983; Scherer and Fischer 1998) überhaupt eine Aktivierung des Gens durch einen entwicklungspezifischen Transkriptionsregulator zugrunde liegt.

Da Kohlenstoffhunger ein wichtiger Faktor in der Einleitung des Entwicklungsprozesses ist, und somit zwangsläufig eine Korrelation zwischen beiden besteht, könnte die Expression von *cpeA* während der Fruchtkörperbildung durch die Annahme einer Hungerinduktion hinreichend erklärt werden. Gegen diese Vermutung spricht jedoch, daß in Kulturen, die aufgrund einer verringerten Glukosekonzentration im Medium keine Fruchtkörper bildeten, zu keiner Zeit während einer Inkubation über 72 Stunden eine signifikante Expression von *cpeA* zu detektieren war, obwohl unter den gewählten Bedingungen bereits nach 48 Stunden die maximale Zellmasse erreicht wird (Zonneveld 1972a). Glukosemangel scheint demnach nicht zwangsläufig eine Aktivierung des Gens zu bewirken. Zudem konnte gezeigt werden,

daß unter Hungerbedingungen, die eine starke transkriptionelle Induktion von *cpeA* zur Folge hatten, weder CPEA-Protein noch Aktivität vorhanden waren. Dies deutet auf eine translationale Kontrolle der Expression hin. Allerdings konnten im 5'-Bereich des *cpeA* Startkodons keine kleinen offenen Leserahmen gefunden werden, deren Translation einen Mechanismus einer solchen Kontrolle in Pilzen darstellt (Luo and Sachs 1996; Wang and Sachs 1997; Sachs 1998). Das Vorhandensein dieser sogenannten μ ORFs ist aber keine zwingende Voraussetzung für eine translationale Kontrolle von Genen in *A. nidulans*, wie am Beispiel einer entwicklungspezifisch exprimierten Katalase gezeigt werden konnte.

In *A. nidulans* wurden bisher drei Katalasen eingehender charakterisiert. CATC wird konstitutiv exprimiert und lokalisiert vermutlich in Peroxisomen (Kawasaki and Aguirre 2001), während CATB in vegetativem Myzel und verstärkt in der Konidiophorentwicklung gebildet wird (Kawasaki et al. 1997; Calera et al. 2000). CATA ist ein sporenspezifisches Enzym, dessen Aktivität sowohl in asexuellen Konidiosporen als auch in meiotischen Ascosporen nachgewiesen wurde. Das *catA* Gen wird entwicklungsabhängig in Sporen exprimiert, sein Transkript akkumuliert aber auch unter verschiedenen Stressbedingungen, wie Glukose- und Nitratlimitierung, in vegetativen Hyphen (Navarro et al. 1996). Das Protein wird jedoch ausschließlich in Sporen gebildet. Der nicht translatierte 5'-Bereich des Transkriptes ist für die zugrundeliegende posttranskriptionelle Regulation notwendig, weist aber keine μ ORFs auf. Als alternativer Kontrollmechanismus wird von den Autoren die Ausbildung einer Sekundärstruktur der RNA in diesem Bereich vorgeschlagen (Navarro 1998). In ähnlicher Weise könnte eine Translationskontrolle auch zur entwicklungsabhängigen Expression von CPEA beitragen.

Entwicklungsspezifische Regulation von *cpeA*

Die Untersuchungen zur Regulation von *cpeA* haben gezeigt, daß hier bereits auf transkriptioneller Ebene eine entwicklungspezifische Aktivierung vorliegt, und mit STUA konnte ein daran beteiligter Regulator identifiziert werden. Der Transkriptionsfaktor STUA gehört zu einer Gruppe pilzlicher Regulatoren, die an der Steuerung morphologischer Differenzierungsprozesse beteiligt sind. Bisher wurden fünf Vertreter dieser Gruppe in verschiedenen Organismen identifiziert. Das *N. crassa* Protein ASM1 besitzt eine essentielle Funktion in der sexuellen Entwicklung, eine *asm1* Mutante ist nicht in der Lage Protoperithezien zu differenzieren (Aramayo et al. 1996). In *Saccharomyces cerevisiae* sind

zwei STUA Homologe bekannt. Während das eine, Phd1, die Ausbildung von Pseudohyphen stimuliert, scheint das andere, Sok2, das filamentöse Wachstum der Hefe zu unterdrücken (Gimeno and Fink 1994; Ward et al. 1995). Das *Candida albicans* Protein Efg1 ist ebenfalls an der Regulation des filamentösen Wachstums beteiligt. STUA ist sowohl an der Regulation der asexuellen als auch der sexuellen Entwicklung beteiligt. Eine *stuA*-Mutante bildet morphologisch veränderte Konidiophore und keine Kleistothezien und Hülle-Zellen. Das *stuA* Gen aus *A. nidulans* weist eine komplexe Regulation auf, die neben einer transkriptionellen auch eine translationale Kontrolle der Expression umfaßt. In der asexuellen Entwicklung agiert STUA als Repressor der zentralen Regulatoren *brlA* und *abaA* und gewährleistet so deren korrekte räumliche und zeitliche Transkription. Ein Zielgen von STUA in der Kleistothezienentwicklung wurde noch nicht identifiziert. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß für die verschiedenen Zelldifferenzierungen unterschiedliche Konzentrationen des Regulators notwendig sind. Für die Bildung der Hülle-Zellen und der Kleistothezienhülle wird eine höhere STUA Konzentration benötigt als für die Ascosporenentwicklung und eine noch geringere Konzentration ist bereits ausreichend für eine vollständige Differenzierung des Konidiophors (Wu and Miller 1997).

Durch die Deletion von STUA-Konsensus-Bindestellen im *cpeA* Promotor wird die entwicklungsabhängige Expression des Transkripts fast vollständig unterdrückt, die hungerabhängige Expression hingegen bleibt erhalten. Daraus kann gefolgert werden, daß STUA *cpeA* unmittelbar als entwicklungspezifischer Regulator aktiviert, aber für eine Hungerinduktion nicht notwendig ist. Ob umgekehrt ein Hungersignal als Voraussetzung notwendig ist, damit eine Induktion durch STUA stattfinden kann, läßt sich aus den Untersuchungen nicht klären. *cpeA* wird sowohl in Abwesenheit jeglicher Kohlenstoffquelle, als auch bei einem Austausch von Glukose gegen Ethanol aktiviert. Dies weist darauf hin, daß der zugrundeliegende Regulationsmechanismus eine Katabolitrepression durch die bevorzugte Kohlenstoffquelle Glukose sein könnte. Diese Annahme wird durch die Häufung von Konsensus-Bindestellen des Katabolitrepressors CREA (Kulmburg et al. 1993) im Promotor von *cpeA* gestützt. Die Analyse des *prn* Genclusters, der Gene für die Verwertung von Prolin als alternative Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle kodiert, hat ergeben, daß trotz bestehender Katabolitrepression eine Induktion durch den positiven Regulator AREA möglich ist (Gonzalez et al. 1997). Damit kann Prolin als Stickstoffquelle erschlossen werden, auch wenn Glukose als Kohlenstoffquelle vorhanden ist. Eine entwicklungsabhängige Aktivierbarkeit von *cpeA* unter katabolitrepräsentierenden Bedingungen ist damit nicht generell ausgeschlossen

und könnte notwendig sein, wenn die sexuelle Entwicklung trotz guter Glukoseversorgung initiiert wird. Eine solche Konstellation tritt bei einem Ungleichgewicht in der Verfügbarkeit von Stickstoff und Kohlenstoff auf. Die Fruchtkörperentwicklung kann dann durch Stickstoffmangel induziert werden, obwohl noch ein Überschuß einer leicht verwertbaren Kohlenstoffquelle vorhanden ist (Zonneveld 1977). Auch für *cpeA* konnte gezeigt werden, daß Stickstoffmangel, unabhängig von der C-Quelle, ausreichend ist für seine transkriptionelle Aktivierung. Es erfolgte unter diesen Bedingungen jedoch nur eine transiente Expression von *cpeA*, die darauf hinweisen könnte, daß ein weiterer positiver Regulator für eine andauernde Aktivierung notwendig ist. Dies könnte STUA sein, so daß Stickstoffhunger nur bei gleichzeitiger Initiation der sexuellen Entwicklung eine dauerhafte Expression des Gens zur Folge hätte.

Die Zielgene von STUA in der asexuellen Entwicklung werden durch die Bindung des Regulators an Elemente mit der Konsensussequenz WCGCGWNM negativ reguliert, im Promotor von *cpeA* vermittelt das gleiche Sequenzmotiv jedoch eine Aktivierung des Gens. Um diese gegensätzlichen Effekte zu erklären, muß gefordert werden, daß STUA mit unterschiedlichen Bindungspartnern interagieren kann, und diese Proteine einen inhibierenden oder fördernden Effekt auf die Transkription haben. Ein Indiz für eine solche Eigenschaft von STUA kommt aus einer Untersuchung in *Saccharomyces cerevisiae*. Hier konnte gezeigt werden, daß die heterologe Expression von STUA zur Aktivierung eines Reporterkonstruktes mit einer STUA-Bindesequenz führte (Dutton et al. 1997). Zudem wird auch für das STUA homologe Protein in *Candida albicans*, Efg1, eine Funktion als Aktivator und Repressor in der Regulation der Pseudohyphenentwicklung vermutet (Stoldt et al. 1997). Weder in *A. nidulans*, noch in *S. cerevisiae* oder *C. albicans* sind die Interaktionspartner der Regulatoren identifiziert, die für diese gegenläufigen Effekte verantwortlich sein könnten.

Eine zentrale Funktion von STUA in der asexuellen Entwicklung ist es, die Regulation von Genen räumlich zu koordinieren, um einen geordneten Ablauf der Zelldifferenzierung zu ermöglichen (Wu and Miller 1997). *stuA* Mutanten zeichnen sich bezüglich der sexuellen Entwicklung dadurch aus, daß sie weder Kleistothezien noch Hülle-Zellen bilden. Der Verlust der Funktion anderer Regulatoren der Fruchtkörperentwicklung, wie *medA* oder *steA* hingegen betrifft nur die Bildung von Kleistothezien, nicht aber die von Hülle-Zellen (Vallim et al. 2000). STUA besitzt demnach eine gesonderte Funktion in der Differenzierung von Hülle-Zellen. Durch die Deletion der STUA-Bindestellen im Promotor von *cpeA* war ein

besonders starker Rückgang der Expression in Hülle-Zellen zu beobachten, im dikaryotischen Myzel der Kleistothezien dagegen änderte sie sich nicht. Dies zeigt, daß STUA die Transkription von *cpeA* spezifisch in Hülle-Zellen steuert, und daß im Inneren der Fruchtkörper ein anderer Mechanismus der Aktivierung bestehen muß, etwa ausschließlich über eine hungerinduzierte Derepression oder durch einen zusätzlichen, bisher nicht identifizierten Faktor.

Die STUA-Bindestellen, die eine Aktivierung von *cpeA* vermitteln, liegen innerhalb des offenen Leserahmens des *Anp5cr* Gens, das eine Pyrrolin-5-Carboxylat Reduktase kodiert, ein Enzym der Prolin-Biosynthese. Die Analyse der Expression ergab, daß *Anp5cr* nur in der vegetativen Wachstumsphase und der asexuellen Entwicklung abgelesen wird, und das Gen damit ein Expressionsmuster aufweist, das gegenüber dem von *cpeA* exakt umgekehrt verläuft. Dies läßt vermuten, daß die Expression beider Gene in der Kleistothezienentwicklung durch STUA gekoppelt ist, indem der Transkriptionsfaktor gleichzeitig als ein entwicklungsspezifischer Aktivator von *cpeA* und Repressor von *Anp5cr* agiert. Eine solch enge Verbindung in der Regulation der Gene wirft die Frage auf, ob es auch einen funktionalen Zusammenhang zwischen beiden geben könnte.

Überlegungen zur Funktion von CPEA

CPEA weist große Ähnlichkeit zu Katalase-Peroxidasen auf, wobei alle Aminosäurereste, denen eine essentielle Funktion für die katalytische Aktivität der Enzyme zugeschrieben wird, konserviert sind. Katalase-Peroxidasen zeichnen sich durch ein weites Spektrum von enzymatischen Aktivitäten aus. Neben einer Katalaseaktivität besitzen die Häm enthaltenden Enzyme eine Peroxidaseaktivität mit breitem Substratspektrum und eine Häm-unabhängige Mangan-Peroxidaseaktivität (Zou and Schrempf 2000). Bisher sind etwa zwanzig Vertreter der Katalase-Peroxidase Familie bekannt, die in Eubakterien, Archaea und Ascomyceten verbreitet sind (Faguy and Doolittle 2000). Mit *cpeA* aus *A. nidulans* wurde die erste vollständige Primärsequenz einer eukaryotischen Katalase-Peroxidase ermittelt. Die ca. 80 kDa großen Proteine gehören zur Überfamilie der Häm-Peroxidasen. Es wird diskutiert, ob sich die Gene durch horizontalen Gentransfer ausgehend von einem Archaeon ausgebreitet haben, eine Hypothese, die deren lückenhafte Verbreitung in bisher analysierten Genomen erklären würde (Zamocky et al. 2000). In ihrer Funktion in der Zelle sind die Katalase-Peroxidasen wenig verstanden und es ist nicht bekannt, welche Substrate sie *in vivo* umsetzen. CPEA wurde ursprünglich als Phenoloxidase beschrieben (Hermann et al. 1983) und konnte

unter Verwendung eines Oxidase-Enzymtests zur Identifizierung aktiver Fraktionen gereinigt werden (Scherer and Fischer 1998). Auch Messungen mit dem gereinigtem Enzym bestätigten, daß H_2O_2 für eine Aktivität nicht benötigt wird. Eine solche Eigenschaft wurde für Katalase-Peroxidasen noch nicht beschrieben, und da mehrere bakterielle Enzyme in Bezug auf ihre katalytischen Fähigkeiten detailliert analysiert sind, ist es unwahrscheinlich, daß eine dominante Oxidase-Aktivität nicht registriert wurde. Eine ähnliche Eigenschaft wurde aber bei pilzlichen Mn Peroxidasen gefunden, die wie Katalase-Peroxidasen Protoporphyrin IX als prosthetische Gruppe enthalten. Auch diese besitzen eine hohe Oxidase-Aktivität und erzeugen in dieser Reaktion H_2O_2 (Kuan and Tien 1993a; Kuan and Tien 1993b). Daß beide Enzyme in der Lage sind Mn (II) zu oxidieren, könnte ein weiterer Hinweis auf Gemeinsamkeiten in den Reaktionsmechanismen sein, mit denen sich die katalytischen Eigenschaften von CPEA erklären ließen.

Weitere Befunde verdeutlichen die Variabilität von Katalase-Peroxidasen, sowohl bezüglich katalytischer als auch struktureller Merkmale, die trotz einer großen Übereinstimmung der Primärsequenzen besteht. So bildet das Protein aus *E. coli* Tetramere (Schellhorn 1995), während das aus *Anacystis nidulans* und dem Ascomyceten *Penicillium simplicissimum* als Dimer vorkommt (Fraaije et al. 1996; Engleder et al. 2000). CPEB aus *Streptomyces reticuli*, die einzige bislang identifizierte extrazelluläre Katalase-Peroxidase hingegen tritt zunächst als Homodimer mit 80 kDa Untereinheiten auf, nach verlängerter Inkubation des Bakteriums wird das Enzym C-terminal prozessiert und liegt dann als Homotetramer mit 60 kDa Untereinheiten vor (Zou and Schrempf 2000). Auch in dem Pilz *Septoria tritici* wird die Reinigung eines Tetramers aus 61 kDa Einheiten beschrieben (Levy et al. 1992), hier ist jedoch das korrespondierende Gen unbekannt, so daß eine verkürzte Primärsequenz nicht ausgeschlossen werden kann. Eine bereits auf DNA Ebene verkürzte Katalase-Peroxidase, der im Vergleich zu anderen Sequenzen ca. 160 Aminosäuren im C-Terminus fehlen, besitzt das photosynthetische Bakterium *Rhodobacter capsulatus* (Forkl et al. 1993). Dieser Bereich der Proteine ist demnach nicht essentiell für die Katalase- und Peroxidase-Aktivität. Zwei Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben Hinweise darauf, daß auch CPEA C-terminal prozessiert werden könnte. So wurde unter ähnlichen Voraussetzungen, die in einer vorangegangenen Aufreinigung des Enzyms (Scherer and Fischer 1998) ein 80 kDa großes Protein angereichert hatten, ein lediglich 60 kDa großes Protein erhalten. Die zur Gewinnung des Rohextraktes verwendete Kultur wurde dabei etwa einen Tag länger inkubiert. Zudem zeigte die *in vitro* Analyse eines C-terminal mit GFP fusionierten CPEA, daß während der

sexuellen Entwicklung zunächst ausschließlich das vollständige Fusionsprotein nachweisbar war, nach einer um 24 h verlängerten Inkubation aber zusätzlich ein kleineres Fragment detektiert werden konnte. Art und zeitlicher Verlauf dieser postulierten Prozessierung weisen damit Übereinstimmungen mit der experimentell erwiesenen Modifikation von CPEB aus *S. reticuli* auf, so daß man einen gemeinsamen Mechanismus vermuten könnte. Es läßt sich spekulieren, ob hierdurch die Aktivität und damit auch die Funktion der Enzyme in der Zelle verändert wird. Die prozessierte Form von CPEB besitzt keine Mn Peroxidase-Aktivität, eine biologische Bedeutung dieser Veränderung der katalytischen Eigenschaft konnte aber bislang nicht gezeigt werden (Zou and Schrepf 2000). Die große Diversität der Katalase-Peroxidasen in den katalytischen und strukturellen Merkmalen könnte darauf hinweisen, daß ihre Funktion nicht konserviert ist, und die in anderen Organismen gewonnenen Erkenntnisse nur bedingt geeignet sind, zur Aufklärung der Funktion von CPEA in der Kleistothezientwicklung von *A. nidulans* beizutragen. Eine Deletionsmutante, deren Analyse einen wichtigen Beitrag leisten könnte, die physiologische Bedeutung des Enzyms zu identifizieren, konnte bislang trotz intensiver Bemühungen nicht erzeugt werden. Es wurden verschiedene Strategien zur Ausschaltung der CPEA Funktion angewendet, aber weder der Versuch der vollständigen Deletion oder Unterbrechung des offenen Leserahmens, noch der einer Expression von Antisense RNA führten zum Erfolg, obwohl mehr als 150 Transformanten in Southern-Blots und mindestens ebensoviele mittels PCR analysiert wurden.

Die Transkription einiger auf molekularer Ebene untersuchten Gene bakterieller Katalase-Peroxidasen nimmt in der späten exponentiellen oder der stationären Phase stark zu. Mutantenstämme, in denen die Katalase-Peroxidase ausgeschaltet ist, zeigen dabei eine deutlich verringerte Überlebensrate in stationären Kulturen und eine höhere Sensitivität gegenüber H_2O_2 (Hochman et al. 1992; Steinman et al. 1997; Rava et al. 1999; Bandyopadhyay and Steinman 2000; Hahn et al. 2000). Die Katalase-Peroxidase Gene von *E. coli* und *Pseudomonas aeruginosa* werden durch RpoS, einen zentralen Regulator der stationären Phase, aktiviert (Schellhorn 1995; Suh et al. 1999). Dies läßt vermuten, daß Nährstofflimitierung ein gemeinsames Element in der Steuerung der Expression von Katalase-Peroxidasen ist. Dies trifft auch für *cpeA* zu, wie die hungerinduzierbare Aktivierung des Gens gezeigt hat. Die Phase des Lebenszyklus, in der *A. nidulans* die sexuelle Entwicklung durchläuft, weist Eigenschaften einer stationären Phase auf, da die maximale Zellmasse der Kultur bereits zu Beginn der Entwicklung erreicht ist (Zonneveld 1972a). Es ist

also denkbar, daß Katalase-Peroxidasen in Bakterien und Pilzen eine ähnliche zelluläre Funktion ausüben, die in Zusammenhang mit einer Anpassung an nährstofflimitierte Bedingungen steht. Aufgrund der katalytischen Eigenschaften der Enzyme sollte die Beseitigung von H_2O_2 dabei eine zentrale Bedeutung haben. Es gibt eine Vielzahl von Beispielen für eine regulatorische Verknüpfung von Anpassungen an Nährstofflimitierung und oxidativen Stress. So werden zum Beispiel beide Katalasegene von *S. cerevisiae* unter Hungerbedingungen aktiviert (Moradas-Ferreira et al. 1996). Auch in höheren Eukaryoten wie *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* konnte dieser Zusammenhang beobachtet werden. Da sich die erhöhte Expression von Katalasen hier lebensverlängernd auswirkt, wird diskutiert, ob eine verringerte Nährstoffzufuhr den Alterungsprozess durch den Erwerb einer verbesserten Resistenz gegenüber oxidativem Stress verlangsamt (Orr and Sohal 1994; Taub et al. 1999). Weit weniger offensichtlich als die geschilderten regulatorischen Zusammenhänge sind jedoch die funktionalen Verbindungen zwischen Hunger und Sauerstoffstress, die erklären könnten, welche metabolischen Veränderungen in der Zelle eine Verstärkung der Stressabwehr unter Hungerbedingungen notwendig machen. Aufgrund dessen lassen die gemeinsamen Regulationselemente der Katalase-Peroxidasen keine konkreten Rückschlüsse auf eine mögliche einheitliche Funktion der Proteine zu.

In Mikroorganismen, die unter nährstofflimitierten Bedingungen Dauerformen bilden, besteht eine entwicklungsabhängige Regulation von Genen, die der Bewältigung von Stress dienen. So wird die sporenspezifische Katalase *katX* von *Bacillus subtilis* unter Kontrolle des σ^F -Faktors exprimiert, der die Differenzierung der Vorskore steuert (Bagyan et al. 1998). In *Streptomyces coelicolor* wird das Hitzeschock Regulon und die Katalase *catB* entwicklungsabhängig abgelesen, und es konnte gezeigt werden, daß eine *catB* Mutante keine Lufthyphen mehr bildet (Puglia et al. 1995; Cho et al. 2000). Auch in *A. nidulans* wurde mit CATA eine sporenspezifische Katalase identifiziert, deren Deletion eine erhöhte Sensitivität der Sporen gegenüber oxidativem Stress und eine verminderte Überlebensfähigkeit von Keimlingen unter Hitzestress verursacht (Noventa-Jordao et al. 1999). Da Sporen unter Umständen längere Perioden überstehen müssen, in denen sie oxidativem Stress ausgesetzt sind, erscheint ein besonders ausgebildetes Stressabwehrsystem sinnvoll. Die Entwicklungszeit der Kleistothezien beträgt selbst unter optimalen Laborbedingungen bereits eine Woche. Da sich die Hülle-Zellen in diesem Zeitraum in einer exponierten Lage auf der Oberfläche der Fruchtkörper befinden, könnte ein ähnlich effektives Abwehrsystem entstanden sein, in das CPEA integriert ist.

In beiden Entwicklungszyklen von *A. nidulans* werden vermehrt stressbezogene Gene exprimiert

Die Analyse von Klonen einer subtraktiven cDNA-Bank der Kleistothezienentwicklung von *A. nidulans* offenbarte einen hohen Anteil von Sequenzen, die aufgrund ihrer Homologien eine Funktion der korrespondierenden Gene in der Anpassung an Stressbedingungen nahelegen. Die Bank wurde durch Subtraktion von cDNA einer Mutante, die keine Kleistothezien bildet, von der cDNA des Wildtyps erzeugt. Beide Stämme wurden unter identischen Bedingungen kultiviert, so daß Gene der allgemeinen Stressadaptation in beiden cDNA-Populationen repräsentiert sein sollten. Nach der Subtraktion beider cDNA-Populationen sollten also nur solche stressbezogenen Gene übrig bleiben, die eine spezifische Funktion in der Fruchtkörperbildung aufweisen. Ein Teil der Gene steht in Zusammenhang mit metabolischen Veränderungen in der Zelle, die sich aufgrund von Nährstoffmangel und der daraus resultierenden Notwendigkeit, alternative Substrate zu verwerten, ergeben. Hexosen stellen eine bevorzugte Energiequelle dar, da sie sich schnell metabolisieren lassen und eine hohe Energieausbeute ermöglichen. Sinkt die Konzentration der Hexosen im Substrat, so muß die Aufnahme der Moleküle effizienter werden, um eine ausreichende Nährstoffversorgung zu gewährleisten. Dies kann durch die Expression von Transportern mit hoher Affinität erreicht werden. Eine cDNA mit einer großen Ähnlichkeit zu solchen Transportern konnte in der subtraktiven Bank identifiziert werden und könnte die Anpassung an limitierende Bedingungen bei gleichzeitig hohem Energiebedarf, verursacht durch die Bildung komplexer Fruchtkörper, widerspiegeln. Sind die bevorzugten Energiequellen versiegt, geht *A. nidulans* zur Nutzung alternativer Substrate, z.B. Alkohole, Aminosäuren, Proteine oder anderer Polymere über. Die Homologien mehrerer Klone weisen auf einen Zusammenhang mit dieser Stoffwechsellumstellung hin. Es wurden zwei Homologe zu Alkohol-Oxidasen und ein Klon mit Ähnlichkeit zu einer Zellulase gefunden, ein weiterer war identisch mit einer alkalischen Protease von *A. nidulans*. Diese Protease ist bereits molekular untersucht und es konnte gezeigt werden, daß das Enzym ausschließlich unter nährstofflimitierenden Bedingungen exprimiert wird (Katz et al. 1994). Sind schließlich alle verwertbaren externen Substrate verbraucht, so muß der Pilz auf eigene Reservestoffe zurückgreifen, um den Energiebedarf der sexuellen Entwicklung zu decken. Diese Reserve wird in *A. nidulans* in Form von α -1,3-Glukan während der vegetativen Wachstumsphase in der Zellwand abgelagert und kann durch die Expression einer α -1,3-Glukanase (Mutanase) in der Fruchtkörperbildung wieder mobilisiert werden. Das Vorhandensein des Reservestoffes ist essentielle Voraussetzung für

die sexuelle Entwicklung (Zonneveld 1972a). Ein cDNA-Fragment der subtraktiven Bank hat Ähnlichkeit zu pilzlichen Mutanasen, so daß vermutet wurde, es könne sich hierbei um die beschriebene α -1,3-Glukanase handeln. Durch die Analyse der Expression des Gens in Abhängigkeit von der Entwicklung und der Verfügbarkeit von Energiequellen konnten Indizien gefunden werden, daß diese Vermutung richtig sein könnte. Die Mutanase wird in der sexuellen Entwicklung sehr stark induziert und der Zeitpunkt dieser Induktion läßt sich durch die Bereitstellung zusätzlicher Energiequellen zurückversetzen und erfolgt erst, wenn sowohl die bevorzugte, wie auch eine alternative Energiequelle aufgebraucht sind. Das Gen erfüllt damit die regulatorischen Voraussetzungen, die gegeben sein müssen, um die unnötige Verschwendung einer wertvollen und gesicherten Resource zu vermeiden. Die Mutanase wurde kloniert und die genomische Sequenz ermittelt. Es konnte ein 48 kDa Protein abgeleitet werden, das ca. 50 % Identität mit anderen pilzlichen Mutanasen aufweist und ein putatives Signalpeptid besitzt, so daß das Enzym vermutlich exkretiert wird. Ein GFP-Fusionsprotein wurde in älteren Hyphen und in Hülle-Zellen lokalisiert, so daß weitere Hinweise auf eine Funktion der Mutanase in der Mobilisierung des Reservestoffes bestehen (siehe Wei, Scherer; im Anhang).

Drei cDNA-Sequenzen hatten Ähnlichkeit mit kleinen Hitzeschock Proteinen, eine Sequenz war identisch mit einem HSP30 Chaperon aus *A. nidulans*, das vermehrt unter Hitzestress gebildet wird (Kusakabe et al. 1994). Die beiden anderen Fragmente sind nicht identisch mit der publizierten Sequenz, zeigen aber Homologie zum selben Abschnitt des Proteins, so daß es sich nicht um verschiedene Teile eines Gens, sondern um eine Familie von HSP30 Genen handelt. Für HSP30 Proteine konnten verschiedene Funktionen gefunden werden, darunter auch solche in der Entwicklung und der Adaption an Hungerbedingungen. In *S. cerevisiae* konnte eine negative Regulation der viel Energie konsumierenden H^+ -ATPase durch HSP30 in Glukose-limitierten Kulturen nachgewiesen werden (Piper et al. 1997). Ein Homolog aus *N. crassa* ist mit Mitochondrien assoziiert. Da Deletionsmutanten eine um 90 % reduzierte Überlebensfähigkeit bei erhöhter Temperatur und gleichzeitiger Glukoselimitierung aufweisen, wird eine Funktion in der Effektivierung des Stoffwechsels unter Stressbedingungen vermutet (Plesofsky-Vig and Brambl 1995). Ein pflanzliches HSP Gen wird während der Zygotenbildung exprimiert und ist nicht hitzeinduzierbar, so daß eine entwicklungspezifische Funktion anzunehmen ist (Carranco et al. 1997). Es sind also verschiedene Rollen der *A. nidulans* HSP30 Proteine in der sexuellen Entwicklung denkbar,

z.B. um durch eine Effektivierung des Energiestoffwechsels den hohen Energiebedarf der Fruchtkörperbildung zu befriedigen.

Dieser Prozess könnte auch die Erhöhung der Anzahl aktiver Atmungsketten einschließen. In *N. crassa* konnte gezeigt werden, daß die Funktionsfähigkeit der Cytochrom-c-Oxidase essentiell für die Ascosporenbildung ist, während der Energiebedarf für das vegetative Wachstum auch ohne dieses Enzym- vermutlich durch die Nutzung alternativer Atmungsketten- bereitgestellt werden kann (Duarte and Videira 2000). Eine cDNA wies Ähnlichkeit zu einer Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit auf und könnte darauf hinweisen, daß auch eine Erhöhung der Transkription von Genen der Atmungskette in der Entwicklung auftritt. Solche Anpassungen können dazu beitragen, Hungerstress zu bewältigen, erzeugen dabei aber ihrerseits oxidativen Stress, da der größte Teil der reaktiven Sauerstoffspezies in der Zelle durch die unvollständige Reduktion von Sauerstoff durch die Cytochrom-c-Oxidase entsteht und ein direkter Zusammenhang zwischen der Anzahl aktiver Atmungsketten und dem Umfang von oxidativem Stress besteht (González-Flecha and Demple 1995). Daß dies ein gravierendes Problem darstellt, veranschaulichen Untersuchungen am Ascomyceten *Podospora anserina*, der einen Alterungsprozess aufweist. Hier konnte gezeigt werden, daß ein Verlust der Funktion der Cytochrom-c-Oxidase mit einer deutlich verlängerten Lebensspanne einhergeht (Dufour et al. 1999). Den gleichen Effekt in diesem Pilz hat auch die verringerte Expression des *PaGrg1* Gens, dessen *A. nidulans* Homolog ebenfalls in der subtraktiven Bank vertreten ist (Kimpel and Osiewacz 1999). Das Gen wird unter Hungerbedingungen sehr stark induziert und kodiert für ein Protein unbekannter Funktion.

Die spezifischen metabolischen Anforderungen in der Fruchtkörperbildung könnten also interne Stressfaktoren erzeugen, denen mit der verstärkten Expression von Enzymen zur Beseitigung von reaktiven Sauerstoffspezies oder zur Reparatur der durch diese verursachten Schäden, begegnet werden muß. In diesem Zusammenhang könnten zwei Homologe von DNA-Reparaturproteinen stehen, die in der cDNA Bank identifiziert wurden.

Durch die statistische Analyse von cDNA-Sequenzen zur Erstellung eines Expressionsprofils der asexuellen Entwicklung von *A. nidulans* konnte auch in diesem Entwicklungszyklus eine Häufung von stressabhängigen Transkripten nachgewiesen werden (Prade et al. 2001). Dies war überraschend, da während der Konidiophorentwicklung die entsprechenden stressauslösenden Faktoren nicht in dem Ausmaß vorhanden sind, wie dies während der

Kleistothezienentwicklung der Fall ist. Als mögliche Erklärung für diesen Befund wird angeführt, daß die Konidiosporen schon in ihrer Entwicklung mit Transkripten ausgestattet werden müssen, die sie später resistent gegenüber widrigen Umwelteinflüssen machen. Dies könnte auch in der Ascosporenentwicklung einen wichtigen Faktor darstellen, zumal diese über lange Zeit im Boden überleben müssen. Die Expression von Genen zur Stressabwehr könnte also in der Fruchtkörperentwicklung eine besonders große Bedeutung haben, und dies könnte wiederum zur Integration entsprechender Gene in entwicklungsabhängige Regulationswege geführt haben.

VI. Literatur

- Adams TH, Boylan MT, Timberlake WE (1988) *brlA* is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. *Cell* 54:353-362
- Adams TH, Wieser JK, Yu J-H (1998) Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:35-54
- Aramayo R, Adams TH, Timberlake WE (1989) A large cluster of highly expressed genes is dispensable for growth and development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 122:65-71
- Aramayo R, Peleg Y, Addison R, Metznerberg R (1996) *Asm-1⁺*, a *Neurospora crassa* gene related to transcriptional regulators of fungal development. *Genetics* 144:991-1003
- Ausubel F et al. (1995) Short protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc.
- Axelrod DE, Greal M, Pastushok M (1973) Gene control of developmental competence in *Aspergillus nidulans*. *Dev Biol* 34:9-15
- Bagyan I, Casillas-Martinez L, Setlow P (1998) The *katX* gene, which codes for the catalase in spores of *Bacillus subtilis*, is a forespore-specific gene controlled by σ^F , and KatX is essential for hydrogen peroxide resistance of the germinating spore. *J Bacteriol* 180:2057-2062
- Bandyopadhyay P, Steinman HM (2000) Catalase-peroxidase of *Legionella pneumophila*: Cloning of the *kata* gene and studies of KatA function. *J Bacteriol* 182:6679-6686
- Benjamin CR (1955) Ascocarps of *Aspergillus* and *Penicillium*. In: *Mycologia*, pp 669-686
- Berteaux-Lecellier V, Picard M, Thompson-Coffe C, Zickler D, Panvier-Adoutte A, Simonet J-M (1995) A nonmammalian homolog of the *PAF1* gene (Zellweger Syndrome) discovered as a gene involved in caryogamy in the fungus *Podospora anserina*. *Cell* 81:1043-1051
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Busby TM, Miller KY, Miller BL (1996) Suppression and enhancement of the *Aspergillus nidulans medusa* mutation by altered dosage of the *bristle* and *stunted* genes. *Genetics* 143:155-163
- Busch S, Hoffmann G, Valerius O, Starke K, Düvel K, Braus GH (2001) Regulation of the *Aspergillus nidulans hisB* gene by histidine starvation. *Curr Genet* 38:314-322
- Calera JA, Sánchez-Weatherby J, López-Medrano R, Leal F (2000) Distinctive properties of the catalase B of *Aspergillus nidulans*. *FEBS Lett* 475:117-120
- Carranco R, Almoguera C, Jordano J (1997) A plant small heat shock protein gene expressed during zygotic embryogenesis but noninducible by heat stress. *J Biol Chem* 272:27470-27475
- Chae K-S, Kim JH, Choi Y, Han DM, Jahng K-Y (1995) Isolation and characterization of a genomic DNA fragment complementing an *nsdD* mutation of *Aspergillus nidulans*. *Mol Cells* 5:146-150
- Champe SP, El-Zayat AE (1989) Isolation of a sexual sporulation hormone from *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol* 171:3982-3988
- Champe SP, Rao P, Chang A (1987) An endogenous inducer of sexual development in *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* 133:1383-1387
- Champe SP, Simon LD (1992) Cellular differentiation and tissue formation. In: Rossomando EF, Alexander S (eds) *Morphogenesis: an analysis of the development of biological form*. Marcel Dekker, New York, pp 63-91
- Cho Y, Lee E, Roe J (2000) A developmentally regulated catalase required for proper differentiation and osmoprotection of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* 35:150-160

- Clutterbuck AJ (1969) A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 63:317-327
- Clutterbuck AJ (1977) The genetics of conidiation in *Aspergillus nidulans*. In: Smith JE, Pateman JA (eds) *Genetics and Physiology of Aspergillus*. Academic Press, London, pp 305-318
- Clutterbuck AJ (1990) The genetics of conidiophore pigmentation in *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* 136:1731-1738
- Clutterbuck AJ (1994) Mutants of *Aspergillus nidulans* deficient in nuclear migration during hyphal growth and conidiation. *Microbiology* 140:1169-1174
- Diatchenko L, Lau Y C, Campbell A P, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov E D, Siebert P D (1996) Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 93
- Duarte M, Videira A (2000) Respiratory chain complex I is essential for sexual development in *Neurospora* and binding of iron sulfur clusters are required for enzyme assembly. *Genetics* 156:607-615
- Dufour E, Boulay J, Rincheval V, Sainsard-Chanet A (1999) A causal link between respiration and senescence in *Podospora anserina*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:4138-4143
- Dutton JR, Johns S, Miller BL (1997) StuAp is a sequence-specific transcription factor that regulates developmental complexity in *Aspergillus nidulans*. *EMBO J* 16:5710-5721
- Eckert SE, Hoffmann B, Wanke C, Braus GH (1999) Sexual development of *Aspergillus nidulans* in tryptophan auxotrophic strains. *Arch Microbiol* 172:157-166
- Engleder M, Regelsberger G, Jakopitsch C, Furtmuller P G, Ruker F, Peschek G A, Obinger C (2000) Nucleotide sequence analysis, overexpression in *Escherichia coli* and kinetic characterization of *Anacystis nidulans* catalase-peroxidase. *Biochimie* 82:211-219
- Faguy DM, Doolittle WF (2000) Horizontal transfer of catalase-peroxidase genes between Archaea and pathogenic bacteria. *Trends Genet* 16:196-197
- Finzel BC, Poulos TL, Kraut J (1984) Crystal structure of yeast cytochrome c peroxidase refined at 1.7-Å resolution. *J Biol Chem* 259:13027-13036
- Fischer R, Timberlake WE (1995) *Aspergillus nidulans* *apsA* (anucleate primary sterigmata) encodes a coiled-coil protein necessary for nuclear positioning and completion of asexual development. *J Cell Biol* 128:485-498
- Forkl H, Vandekerckhove J, Drews G, Tadros MH (1993) Molecular cloning, sequence analysis and expression of the gene for catalase-peroxidase (*cpeA*) from the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus* B10. *Eur J Biochem* 214:251-258
- Fraaije MW, Roubroeks HP, Hagen WR, van Berkel WJH (1996) Purification and characterization of an intracellular catalase-peroxidase from *Penicillium simplicissimum*. *Eur J Biochem* 235:192-198
- Jimeno CJ, Fink GR (1994) Induction of pseudohyphal growth by overexpression of *PHD1*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene related to transcriptional regulators of fungal development. *Mol Cell Biol* 14:2100-2112
- Gonzalez R, Gavrias V, Gomez D, Scazzocchio C, Cubero B (1997) The integration of nitrogen and carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans* requires the GATA factor AreA and an additional positive-acting element, ADA. *EMBO J* 16:2937-2944
- González-Flecha B, Demple B (1995) Metabolic sources of hydrogen peroxide in aerobically growing *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 270:13681-13687
- Hahn J, Oh S, Roe J (2000) Regulation of the *furA* and *catC* operon, encoding a ferric uptake regulator homologue and catalase-peroxidase, respectively, in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* 182:3767-3774

- Hermann TE, Kurtz MB, Champe SP (1983) Laccase localized in Hulle cells and cleistothecial primordia of *Aspergillus nidulans*. J Bacteriol 154:955-964
- Hochman A, Figueredo A, Wall JD (1992) Physiological functions of hydroperoxidases in *Rhodobacter capsulatus*. J Bacteriol 174:3386-3391
- Hoffmann B, Wanke C, LaPaglia KS, Braus GH (2000) c-Jun and RACK1 homologues regulate a control point for sexual development in *Aspergillus nidulans*. Mol Microbiol 37:28-41
- Käfer E (1977) Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and its chromosomal aberrations. Adv Genet 19:33-131
- Katz ME, Rice RN, Chetham BF (1994) Isolation and characterization of an *Aspergillus nidulans* gene encoding an alkaline protease. Gene 150:287-292
- Kawasaki L, Aguirre J (2001) Multiple catalase genes are differentially regulated in *Aspergillus nidulans*. J Bacteriol 183:1434-1440
- Kawasaki L, Wysong D, Diamond R, Aguirre J (1997) Two divergent catalase genes are differentially regulated during *Aspergillus nidulans* development and oxidative stress. J Bacteriol 179:3284-3292
- Kimpel E, Osiewacz HD (1999) *PaGrg1*, a glucose-repressible gene of *Podospora anserina* that is differentially expressed during lifespan. Curr Genet 35:557-563
- Kuan I, Tien M (1993a) Glyoxylate-supported reactions catalyzed by Mn peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: Activity in the absence of added hydrogen peroxide. Arch Biochem Biophys 302:447-454
- Kuan I, Tien M (1993b) Stimulation of Mn peroxidase activity: A possible role for oxalate in lignin biodegradation. Proc Natl Acad Sci USA 90:1242-1246
- Kulmburg P, Mathieu M, Dowzer C, Kelly J, Felenbok B (1993) Specific binding sites in the *alcR* and *alcA* promoters of the ethanol regulon for the CREA repressor mediating carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mol Microbiol 7:847-857
- Kusakabe T, Koga K, Sugimoto Y (1994) Isolation and characterization of cDNA and genomic promoter region for a heat shock protein 30 from *Aspergillus nidulans*. Biochim Biophys Acta 1219:555-558
- Laemmli U K (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685
- Levy E, Eyal Z, Hochman A (1992) Purification and characterization of a catalase-peroxidase from the fungus *Septoria tritici*. Arch Biochem Biophys 296:321-327
- Luo Z, Sachs MS (1996) Role of an upstream open reading frame in mediating arginine-specific translational control in *Neurospora crassa*. J Bacteriol 178:2172-2178
- Masloff S, Pöggeler S, Kück U (1999) The *pro1*⁺ gene from *Sordaria macrospora* encodes a C₆ zinc finger transcription factor required for fruiting body development. Genetics 152:191-199
- Mauro JM et al. (1988) Tryptophan-191----phenylalanine, a proximal-side mutation in yeast cytochrome c peroxidase that strongly affects the kinetics of ferrocytochrome c oxidation. Biochem 27:6243-6256
- Mazur P, Meyers HV, Nakanishi K (1990) Structural elucidation of sporogenic fatty acid metabolites from *Aspergillus nidulans*. Tetrahedron letters 31:3837-3840
- Miller KY, Toennis TM, Adams TH, Miller BL (1991) Isolation and transcriptional characterization of a morphological modifier: The *Aspergillus nidulans* stunted (*stuA*) gene. Mol Gen Genet 227:285-292
- Miller KY, Wu J, Miller BL (1992) *stuA* is required for cell pattern formation in *Aspergillus*. Genes Dev 6:1770-1782
- Mirabito PM, Adams TH, Timberlake WE (1989) Interactions of three sequentially expressed genes control temporal and spatial specificity in *Aspergillus* development. Cell 57:859-868

- Mooney JL, Yager LN (1990) Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes Dev* 4:1473-1482
- Moradas-Ferreira P, Costa V, Piper P, Mager W (1996) The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. *Mol Microbiol* 19:651-658
- Morris NR (1976) Mitotic mutants of *Aspergillus nidulans*. *Genet Res* 26:237-254
- Navarro RE (1998) Posttranscriptional control mediates cell type-specific localization of catalase A during *Aspergillus nidulans* development. *J Bacteriol* 180:5733-5738
- Navarro RE, Stringer MA, Hansberg W, Timberlake WE, Aguirre J (1996) *catA*, a new *Aspergillus nidulans* gene encoding a developmentally regulated catalase. *Curr Genet* 29:352-359
- Noventa-Jordao MA, Couto R M, Goldman M H S, Aguirre J, Iyer S, Caplan A, Terenzi H F, Goldman G H (1999) Catalase activity is necessary for heat-shock recovery in *Aspergillus nidulans* germlings. *Microbiology* 145:3229-3234
- Nowrousian M, Masloff S, Pöggeler S, Kück U (1999) Cell differentiation during sexual development of the fungus *Sordaria macrospora* requires ATP citrate lyase activity. *Mol Cell Biol* 19:450-460
- Orr WC, Sohal RS (1994) Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science* 263:1128-1130
- Piper PJ, Ortiz-Calderon C, Holyoak C, Coote P, Cole M (1997) Hsp30, the integral plasma membrane heat shock protein of *Saccharomyces cerevisiae*, is a stress inducible regulator of plasma membrane H⁺-ATPase. *Cell Stress Chaperones* 2:12-24
- Plesofsky-Vig N, Brambl R (1995) Disruption of the gene for hsp30, an alpha-crystallin-related heat shock protein of *Neurospora crassa*, causes defects in thermotolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:5032-5036
- Pontecorvo G, Roper JA, Hemmons LM, MacDonald KD, Bufton AWJ (1953) The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics* 5:141-238
- Prade RA, Ayoubi P, Krishnan S, Macwana S, Rusell H (2001) Accumulation of stress and inducer-dependent plant-cell-wall-degrading enzymes during asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 157:957-967
- Puglia AM, Vohradsky J, Thompson CJ (1995) Developmental control of the heat-shock stress regulon in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* 17:737-746
- Rava PS, Somma L, Steinman HM (1999) Identification of a regulator that controls stationary-phase expression of catalase-peroxidase in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* 181:6152-6159
- Sachs MS (1998) Posttranscriptional control of gene expression in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol* 23:117-125
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Schellhorn HE (1995) Regulation of hydroperoxidase (catalase) expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Letters* 131:113-119
- Scherer M, Fischer R (1998) Purification and characterization of laccase II of *Aspergillus nidulans*. *Arch Microbiol* 170:78-84
- Sievers N, Krüger M, Fischer R (1997) Kreuzung von *Aspergillus nidulans*. *Biol Unserer Zeit* 6:383-388
- Skromne I, Sánchez O, Aguirre J (1995) Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans* *brlA* regulatory gene. *Microbiology* 141:21-28
- Steinman HM, Fareed F, Weinstein L (1997) Catalase-peroxidase of *Caulobacter crescentus*: Function and role in stationary-phase survival. *J Bacteriol* 179:6831-6836
- Stoldt VR, Sonneborn A, Leuker CE, Ernst JF (1997) Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved

- class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *EMBO J* 16:1982-1991
- Stringer MA, Dean RA, Sewall TC, Timberlake WE (1991) *rodletless*, a new *Aspergillus* developmental mutant induced by directed gene inactivation. *Genes Dev* 5:1161-1171
- Suh S, Silo-Suh L, Woods DE, Hassett DJ, West SEH, Ohman DE (1999) Effect of *rpoS* mutation on the stress response and expression of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 181:3890-3897
- Taub J, Lau J F, Ma C, Hahn J, Hoque R, Rothblatt J, Chalfie M (1999) A cytosolic catalase is needed to extend adult lifespan in *C. elegans daf-C* and *clk-1* mutants. *Nature* 399:162-166
- Timberlake WE (1990) Molecular genetics of *Aspergillus* development. *Ann Rev Genet* 24:5-36
- Timberlake WE (1991) Temporal and spatial controls of *Aspergillus* development. *Curr Opin Genet and Dev* 1:351-357
- Timberlake WE, Marshall MA (1989) Genetic engineering of filamentous fungi. *Science* 244:1313-1317
- Vallim MA, Miller KY, Miller BL (2000) *Aspergillus* SteA (Sterile12-like) is a homeodomain-C₂/H₂-Zn²⁺ finger transcription factor required for sexual reproduction. *Mol Microbiol* 36:290-301
- Wang Z, Sachs MS (1997) Ribosome stalling is responsible for arginine-specific translational attenuation in *Neurospora crassa*. *Mol Cell Biol* 17:4904-4913
- Ward M (1991) *Aspergillus nidulans* and other filamentous fungi as genetic systems. In: *Modern microbial genetics*. Wiley-Liss, Inc., pp 455-496
- Ward MP, Gimeno CJ, Fink GR, Garrett S (1995) *SOK2* may regulate cyclic AMP-dependent protein kinase-stimulated growth and pseudohyphal development by repressing transcription. *Mol Cell Biol* 15:6854-6863
- Waring RB, May GS, Morris NR (1989) Characterization of an inducible expression system in *Aspergillus nidulans* using *alcA* and tubulin coding genes. *Gene* 79:119-130
- Wu J, Miller BL (1997) *Aspergillus* asexual reproduction and sexual reproduction are differentially affected by transcriptional and translational mechanisms regulating *stunted* gene expression. *Mol Cell Biol* 17:6191-6201
- Yelton MM, Hamer JE, Timberlake WE (1984) Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:1470-1474
- Zamocky M, Janecek S, Koller F (2000) Common phylogeny of catalase-peroxidases and ascorbate peroxidases. *Gene* 256:169-182
- Zamocky M, Regelsberger G, Jakopitsch C, Obinger C (2001) The molecular peculiarities of catalase-peroxidases. *FEBS Lett* 492:177-182
- Zonneveld BJM (1972a) Morphogenesis in *Aspergillus nidulans*. The significance of α -1,3 glucan of the cell wall and α -1,3 glucanase for cleistothecium development. *Biochim Biophys Acta* 273:174-187
- Zonneveld BJM (1972b) A new type of enzyme, an exo-splitting α -1,3 glucanase from non-induced cultures of *Aspergillus nidulans*. *Biochim Biophys Acta* 258:541-547
- Zonneveld BJM (1972c) The significance of α -1,3-glucan of the cell wall and α -1,3-glucanase for cleistothecium development. *Biochim Biophys Acta* 273:174-187
- Zonneveld BJM (1974) α -1,3 glucan synthesis is correlated with α -1,3 glucanase synthesis, conidiation and fructification in morphogenetic mutants of *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* 81:445-451
- Zonneveld BJM (1975) Sexual differentiation in *Aspergillus nidulans*, The requirement for manganese and the correlation between phosphoglucomutase and the synthesis of reserve material. *Arch Microbiol* 105:105-108

- Zonneveld BJM (1977) Biochemistry and ultrastructure of sexual development in *Aspergillus*. In: Smith JE, Pateman JA (eds) Genetics and Physiology of *Aspergillus*. Academic Press, London, pp 58-80
- Zou P, Borovok I, de Orue Lucana DO, Müller D, Schrempf H (1999) The mycelium-associated *Streptomyces reticuli* catalase-peroxidase, its gene and regulation by FurS. *Microbiology* 145:549-559
- Zou P, Schrempf H (2000) The heme-independent manganese-peroxidase activity depends on the presence of the C-terminal domain within the *Streptomyces reticuli* catalase-peroxidase CpeB. *Eur J Biochem* 267:2840-2849

Molecular characterization of a blue-copper laccase, *TILA*, of *Aspergillus nidulans*

Mario Scherer and Reinhard Fischer*

Laboratorium für Mikrobiologie, Philipps-Universität Marburg and Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie
Karl-von-Frisch-Str. D-35043 Marburg, Germany

*Corresponding author

Abstract

Laccases are blue copper enzymes, which oxidize phenolic substrates and thereby reduce molecular oxygen. They are widespread within fungi and are involved in lignin degradation or secondary metabolism such as pigment biosynthesis. Many fungi contain several laccases, not all of whose functions are known. In *A. nidulans* one, *yA*, is expressed during asexual development and converts a yellow precursor to the green pigment. We identified a second laccase gene, which encodes a 66.3 kDa protein 37.6 % identical to laccase I (YA) of *A. nidulans*. The protein harbors an N-terminal secretion signal, and three characteristic copper binding centers. The enzyme localizes at the growing hyphal tip. The gene was therefore named *tilA* (= tip laccase). Deletion or overexpression of the gene had no discernable phenotype under laboratory conditions.

Key words: *Aspergillus nidulans*, laccase, polar growth, melanin, copper enzyme, oxidase

1. Introduction

Laccases comprise a group of enzymes characterized by their copper content and their oxidative capacity using phenolic compounds as substrates and oxygen as terminal electron acceptor. Together with ascorbate oxidase and ceruloplasmin, these enzymes belong to the blue multicopper oxidase family and are found in many organisms [1]. Whereas ceruloplasmin is a common enzyme in animals, ascorbate oxidase is a plant enzyme, and laccases are found in both plant and fungi. Although widespread in nature, the biological function of laccases is not yet resolved for most of the enzymes. They play roles in processes as different as lignin degradation and pigment biosynthesis, and many fungi contain several different laccases [2]. White-rot basidiomycetes secrete laccases to degrade lignin in an oxidative manner, while other

fungi produce these enzymes to degrade a variety of aromatic substrates [3]. Because of the relative broad substrate spectrum of laccases and their delignifying properties, this enzyme class recently gained some interest in industry for their capability to detoxify phenolic substances in wastewater. An example, in which the oxidative capacity of laccases enables subsequent polymerization, is the biosynthesis of some melanins. Although several biosynthetic pathways have been described for this polyketide derivative, a prominent route in ascomycetes is from acetate via 1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene and 1,8-dihydroxynaphthalene, and requires in a later step of the synthesis a laccase to yield melanin [4]. Since melanin is an important compound in pathogenic fungi, laccases can be regarded as virulence factors in those organisms. The human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* produces melanin

when infecting man. Deletion of genes encoding enzymes involved in its biosynthesis reduces virulence dramatically and thus laccase is discussed as a candidate for a new drug target [5].

Laccases are not only found in fungi which degrade lignin or which have a pathogenic potential, but also in saprotrophic molds such as *Neurospora crassa*, *Podospora anserina* or *A. nidulans*. In *A. nidulans* at least four phenol oxidases have been described to date, three of which are developmentally regulated and only expressed during the course of asexual or sexual development [6]. One enzyme with catalytic properties of a phenol oxidase is tyrosinase, which was identified in hyphae of *A. nidulans* [7]. It was suggested that this enzyme is involved in hyphal melanin biosynthesis, which comprises 8-12 % of the fungal hyphal cell wall [8]. The second enzyme of this class is cresolase, which is expressed during asexual development and is involved in pigment biosynthesis of the conidiophore stalk and vesicle [9]. Laccase I, encoded by the gene *γA*, becomes expressed later during conidiophore morphogenesis and is involved in the dark green pigmentation of the conidiospores [10]. Lack of this enzyme, leads to yellow-pigmented spores instead of mature green ones. Laccase II is expressed during the sexual developmental cycle primarily in primordia and hülle cells [11, 12]. Cloning of the corresponding gene revealed that it encodes a haem-containing catalase-peroxidase (with laccase enzyme activity) and not a copper-containing laccase (unpublished results).

As an approach to obtain the corresponding DNA sequence of the sexual cycle specific laccase II gene, a laccase was cloned, whose partial sequence appeared in an *A. nidulans* cDNA EST database (Oklahoma City, USA). Sequence and expression analyses revealed that this laccase is different from laccase II and not transcriptionally upregulated during development. Since the protein localizes at the hyphal tip, we named it *tilA* (tip laccase).

2. Materials and methods

2.2 Aspergillus nidulans strains and growth conditions.

Supplemented minimal and complete media and standard strain construction procedures were as described [13]. Standard laboratory *Escherichia coli* strains (XL-1 blue, Top 10 F') were used. *A. nidulans* strains: GR5 (*pyrG89*; *wA3*; *pyroA4*; *veA1*); SC3 (*pabaA1*, *γA2*, \square *argB::trpC* \square *B*; *veA1*, mutation in a gene that induces precocious sexual development); SMS5 (SC3 transformed with pDC1 and pMS11); SMS18 (GR5 transformed with pMS13; double crossover and replacement of *tilA*; primary strain crossed to RMS011; progeny strain with \square *tilA*, no other nutritional markers); SMS28 (progeny strain like SMS18 but with *tilA* wild type situation).

2.2 Molecular biological methods, plasmids and strain construction.

Plasmid preparations and Southern and Northern blot analyses were performed according to standard protocols and manuals of the suppliers of membranes. RNA, DNA and Protein isolation was described previously [14]. Standard protocols were used to generate transgenic fungal strains [15]. Plasmids: pMS1 (5.3 kb *Bam*HI subclone from cosmid L24A05 in pUC18); pMS2 (3.3 *Bam*HI/*Bgl*II subclone from pMS1 in pUC18); pMS13 (*tilA* deletion plasmid) (pMS2 PCR amplified with primer 1 (5'-CCGCGACGGCGTAGAAAACCC-3') and primer 3 (5'-CCGCGAGGAAGTATCTGAACAGG-3') (see Fig. 1) to replace *tilA* open reading frame with a *Not*I restriction site; insertion of *pyr4* as a *Not*I fragment into the created *Not*I site); pMS11 (same strategy as for pMS13 but with primer 1 and 2 (5'-CCGCAAGCTGATATTCCTCCGG-3'), insertion of *Not*I in front of stop codon, insertion of HA as a *Not*I fragment; see Fig. 1).

2.3 Immunostaining and microscopy.

In immunofluorescence experiments, the protocol of Fischer and Timberlake [16] was followed, but before Novozyme digestion germlings were washed in MTSB buffer (PIPES 50mM, pH 7; EGTA 5mM; MgSO₄ 1mM) and methanol extraction was performed at room temperature. Samples were blocked in TBS buffer (1% BSA added) 15 min before antibody treatment. The antibodies were purchased from: Monoclonal mouse anti-HA (Babco, Freiburg); FITC-labeled polyclonal secondary antibodies (Sigma, Taufkirchen), goat anti-mouse, rabbit anti-goat and goat anti-rabbit. The polyclonal antibodies were treated with acetone powder.

3. Results

3.1 Cloning of *tilA*

Laccases very often serve special functions during certain developmental stages of fungi or as an adaptation to nutritional requirements. During our work on laccase II of *A. nidulans*, which is differentially expressed during the sexual cycle of the mold, a laccase partial sequence appeared in the Oklahoma EST-sequencing database. This gene was analyzed in the present work, and we found that it is not laccase II and thus not differentially expressed during developmental processes. The partial sequence information from the database was used to PCR amplify the region, radioactively label the DNA and isolate the corresponding cosmid L24A05 derived from chromosome VIII from an ordered cosmid library (FGSC, Kansas, USA) by colony hybridization. Further subcloning of the gene revealed a 5.3 kb *Bam*HI fragment, which was sequenced on both strands (**Fig. 1**). Since no signal in Northernblot analyses was obtained, we concluded that the gene is expressed at a low level. However, expression was confirmed through the generation of cDNA by reverse PCR (results not shown). The obtained cDNA fragments were sequenced and compared to the genomic DNA sequence. After the removal of 2 introns of 62 and 63 bp length, both with consensus splice sequences, an open

reading frame of 599 aa could be deduced (**Fig. 1**). After the stop codon a 144 bp non-translated trailer with no additional potential open reading frames has been found. The deduced protein has a predicted molecular mass of 66.3 kDa and an isoelectric point of 5.3. Three copper binding sites, which are predicted to coordinate four copper atoms, were detected as described for other laccase enzymes. After the first 25 amino acids a possible cleavage site was detected (Heijne's method for signal sequence recognition, pSORT-Program, <http://psort.nibb.ac.jp/cgi-bin/runpsort.pl>) suggesting secretion of the enzyme. In addition, subcellular localization predictions using this program calculated 44.4 % for extracellular residence including the cell wall.

The protein displays high homology to several laccase and ascorbate oxidase enzymes, with the highest degree of similarity (42.2 % identity) to *A. fumigatus* ABR2, which is involved in melanin biosynthesis [17]. The next closest relatives of TILA are *A. nidulans* YA with 37.6 % and plant ascorbate oxidases. Both, ABR2 and YA are conidiation-specific enzymes. Other ascomycetous laccases and basidiomycetous laccases, which are involved in lignin degradation, are less similar (**Fig. 2**). Because of the subcellular localization of the protein (see below), we named the gene *tilA*. In addition to TILA, the 5.3 kb *Bam*HI restriction fragment contained another open reading frame with similarities to Zn(2)-Cys(6) motif containing proteins. Several small open reading frames of up to 74 amino acids were found upstream of the *tilA* start codon, suggesting posttranscriptional regulation of expression [18].

3.2 TILA is expressed after spore germination and localizes at the growing fungal hyphal tip

After the determination of the primary structure of the TILA protein, we wanted to analyze the temporal and spatial expression pattern of the enzyme. Therefore the polypeptide was translationally fused to the hemagglutinin epitope of the human influenza virus (3xHA)(pMS11). The fusion protein was expressed in *A. nidulans* strain

SMS5 and subsequently detected during growth and development of the fungus (**Fig. 3**). The monoclonal anti-HA antibodies detected a protein with an apparent molecular mass of 65 kDa, which is well in agreement with the predicted molecular mass of TILA::3xHA. The TILA protein appeared very early during germination of the conidiospores and remained with an unchanged expression level during asexual growth, but decreased during sexual development.

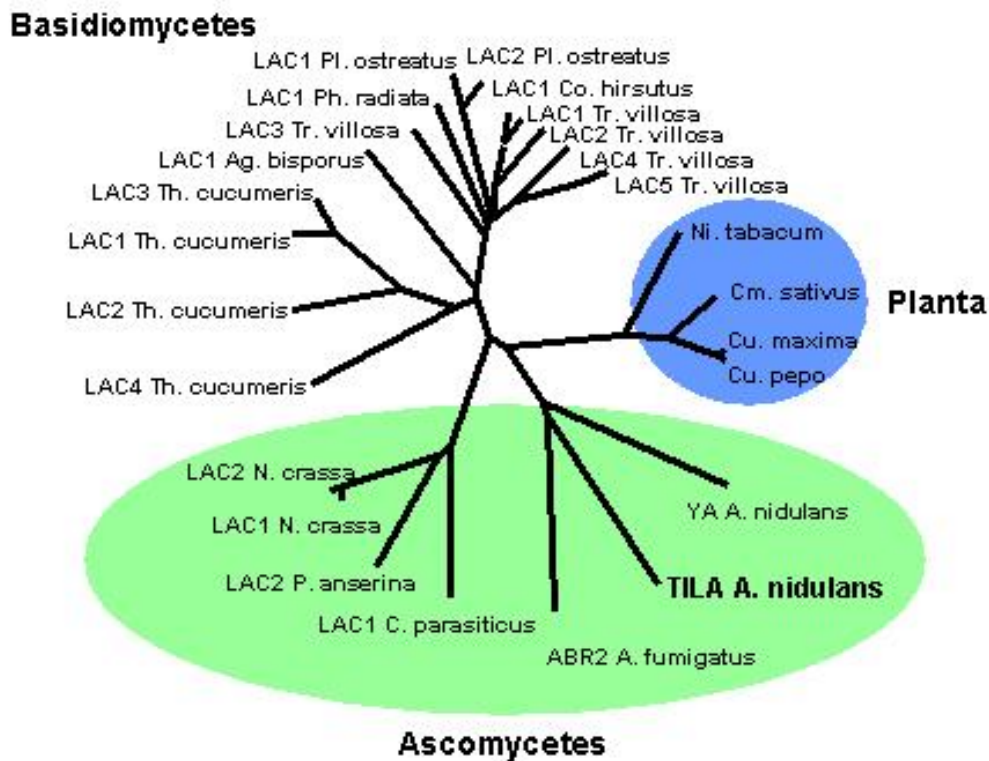


Fig. 2: Phylogenetic tree of different fungal laccases plant ascorbate oxidases. The alignment of the protein sequences was done with the program ClustalW available under <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>. The genera are abbreviated as follows: Pleurotus (=Pl); Phlebia (=Ph); Agaricus (=Ag); Thanatephorus (=Th); Neurospora (=N); Podospora (=P); Aspergillus (=A); Cucurbita (=Cu); Cucumis (=Cm); Nicotiana (=Ni); Trametes (= Tr); Coriolus (=Co); Cryptonectria (=C).

In order to specify the subcellular localization of the protein, secondary immunofluorescence was used with mouse anti-HA and anti-mouse FITC-labeled secondary antibodies. Germinated spores of SMS5 were processed for immunostaining according to a standard protocol but no specific signal was detected. Only after application of a "sandwich technique" using three layers of fluorescently labeled antibodies, goat anti-mouse-, rabbit anti-goat- and goat anti-rabbit-antibodies, specific signals were identified at the hyphal tip of elongating hyphae. The protein appeared very early during germination and remained at the hyphal tip during further growth. The protein could not be detected in all germlings and prolonged digestion of the cell wall led to a loss of the signal, suggesting a localization of TILA in the cell wall (Fig. 4).

3.3 Deletion of *tilA*

We replaced the open reading frame of *tilA* in plasmid pMS13 with the strategy described in Fig. 1. After transformation of pMS13 into GR5, uracil-auxotrophic transformants were analyzed by Southern blot for homologous integration of the construct. Among 40 colony-purified strains tested one displayed the right banding pattern. This strain was crossed to RMSO11 and progeny were analyzed by Southern blot. About 50 % (14 strains tested) with different genotypes carried the *tilA* knockout situation (Fig. 5), which was further confirmed by PCR (results not shown). The *tilA* deletion strain (SMS18) was compared to a progeny strain of the above cross with the *tilA* wild type situation. No difference

with regards to hyphal growth, asexual or sexual development was observed.

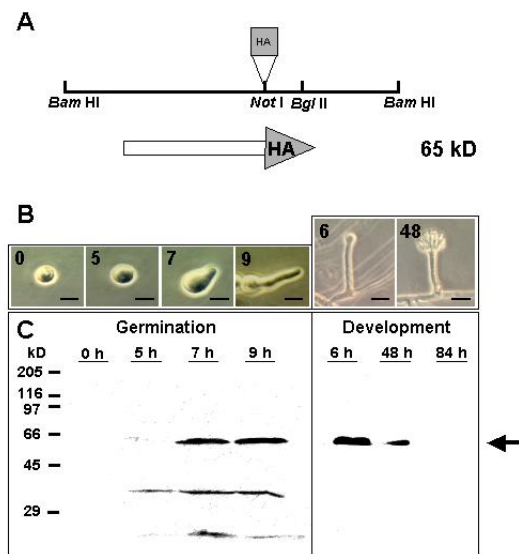


Fig. 3: Expression of TILA during the life-cycle of *A. nidulans*. **(A)** Schematic draw of the construct, which was used to tag the TILA protein with the HA-epitope (3xHA) (pMS11). **(B)** Protein analysis. Conidiospores were inoculated into liquid complete media, germinated and grown for 5, 7 and 9 hours before protein analysis. Hyphae were grown for 20 hours before transfer to an agar surface to induce asexual (6 h and 48 h) and sexual development (84 h). Upper panels: Representative pictures of developmental stages. Scale bars represent 5 μ m (0, 5 and 7 h); 10 μ m (9 h); 20 μ m (6) and 30 μ m (48 h after induction). **(C)** Western blot. Protein extracts were prepared by grinding the material of the stages indicated in \square in liquid nitrogen, suspension in buffer (10 mM Tris-HCl pH7.5 containing protease inhibitors Pefabloc, Pepstatin and Leupeptin in concentrations as recommended by the supplier) and clearance of the crude extract by centrifugation. 25 μ g of total protein were loaded in each lane. The protein was detected using the ECL detection kit (Amersham, Freiburg).

4. Discussion

The localization and expression pattern of the enzyme might indicate a function of the protein at the hyphal tip. Many laccases are described as being involved in the degradation of phenolic substances. For this purpose the enzymes need to be secreted and are found in the supernatant of a culture. Thus, the subcellular localization of TILA at the hyphal tip could represent a transient stage of the secretion pathway. However, germinating spores are not exposed to phenolic substances in the media just after inoculation and secondly an accumulation of

toxic metabolic substances in the cell are also unlikely to be accumulated in the conidiospore. In addition, incubation of the cells in the presence of different phenolic substances did not lead to a transcriptional induction of *tilA* (results not shown). Therefore, the localization of TILA at the hyphal tip most likely indicates an action of the enzyme in the cell wall. Several possible functions can be envisaged. (i) TILA could be involved in melanin biosynthesis as is its closest homologue ABR2 from *A. fumigatus* [17]. Melanin comprises 8-12 % of the *A. nidulans* cell wall of hyphae [8]. Although transmission electron microscopic studies revealed a melanin layer only in older hyphae, it could be that minor melanin levels are established much earlier during hyphal growth. An argument against a role of TILA in hyphal growth is that deletion or overexpression of the gene did not cause any phenotype with regards to hyphal growth rate, colony morphology, carbon source utilization or asexual or sexual development (results not shown).

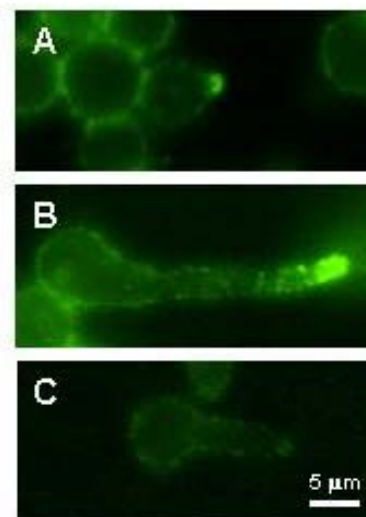


Fig. 4: Subcellular localization of TILA at the hyphal tip by immunofluorescence. Conidiospores of SMS 5 were germinated on cover slips, incubated for 10-16 h and processed for immunostaining. **A** Conidiospore with a very short germ tube. **B** Conidiospore with an elongated germ tube. The immunofluorescence remains mainly at the hyphal tip. **C** Wild type control. This strain does not contain any HA epitope. The cell wall of the entire germling is weakly stained. The tip does not show any particular fluorescence. The specimens were mounted in Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame,

CA, USA) and observed in a fluorescence microscope (Zeiss Axiovert with the FITC filter set No. 9 from Zeiss).

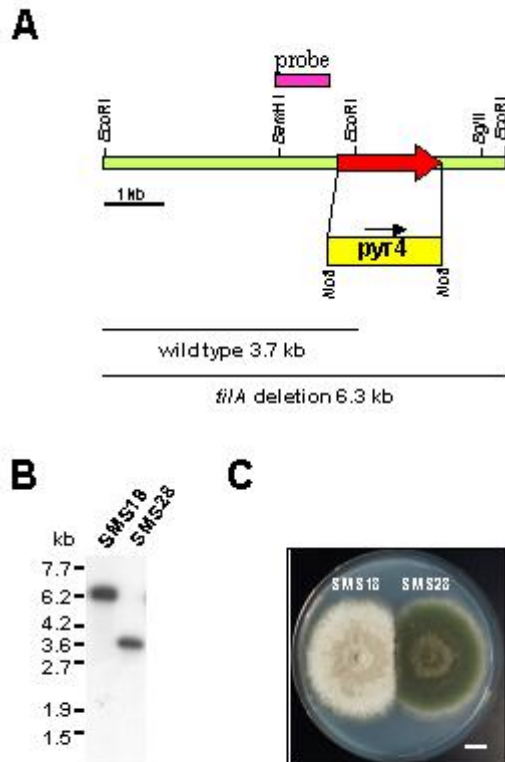


Fig. 5: Deletion of *tilA*. (A) Scheme of the deletion construct and the replacement event. (B) Southern blot of the *tilA* deletion strain SMS18 (\square *tilA*) and SMS28 (*tilA* wild type). Genomic DNA was digested with *EcoRI*, separated on a 1 % agarose gel, blotted onto a nylon membrane and hybridized to the probe indicated in A. (C) Colonies of SMS18 and SMS28 after 4 days of growth on minimal media. (Scale bar = 1 cm)

5. Acknowledgements

The work was supported by the SFB 395 and the Deutsche Forschungsgemeinschaft. M. Scherer was a fellow of the "Graduiertenkolleg Enzymchemie".

6. References

- [1] Messerschmidt, A. and Huber, R. (1990) The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin. *Eur. J. Biochem.* 187, 341-352.
- [2] Thurston, C.F. (1994) The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140, 19-26.
- [3] Xu, F. (1996) Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry* 35, 7608-7614.
- [4] Bell, A.A. and Wheeler, M.H. (1986) Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Ann. Rev. Phytopath.* 24, 411-451.
- [5] Williamson, P.R. (1997) Laccase and melanin in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Front Biosci.* 2, 299-2107.
- [6] Griffith, G.W., *Phenoloxidases*, in *Aspergillus: 50 years on*, S.D. Martinelli and J.R. Kinghorn, Editors. 1997, Elsevier: Amsterdam. p. 763-788.
- [7] Bull, A.T. and Carter, B.L.A. (1973) The isolation of tyrosinase from *Aspergillus nidulans*, its kinetic and molecular properties and some consideration of its activity *in vivo*. *J. Gen. Microbiol.* 75, 61-73.
- [8] Chung, Y.S., Chae, K.-S., Han, D.M., and Jahng, K.-Y. (1996) Chemical composition and structure of hyphal wall of null-pigment mutant of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cells* 6(6), 731-736.
- [9] Birse, C.E. and Clutterbuck, A.J. (1990) N-Acetyl-6-hydroxytryptophan oxidase, a developmentally controlled phenol oxidase from *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 136, 1725-1730.
- [10] Aramayo, R. and Timberlake, W.E. (1993) The *Aspergillus nidulans* *yA* gene is regulated by *abaA*. *EMBO J.* 12(5), 2039-2048.
- [11] Hermann, T.E., Kurtz, M.B., and Champe, S.P. (1983) Laccase localized in Hulle cells and cleistothecial primordia of *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* 154(2), 955-964.
- [12] Scherer, M. and Fischer, R. (1998) Purification and characterization of laccase II of *Aspergillus nidulans*. *Arch. Microbiol.* 170, 78-84.

- [13] Käfer, E. (1977) Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and its chromosomal aberrations. *Adv. Genet.* 19, 33-131.
- [14] Schier, N., Liese, R., and Fischer, R. (2001) A *pcl*-like cyclin of *Aspergillus nidulans* is transcriptionally activated by developmental regulators and is involved in sporulation. *Mol. Cell. Biol.* in press.
- [15] Yelton, M.M., Hamer, J.E., and Timberlake, W.E. (1984) Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1470-1474.
- [16] Fischer, R. and Timberlake, W.E. (1995) *Aspergillus nidulans apsA* (anucleate primary sterigmata) encodes a coiled-coil protein necessary for nuclear positioning and completion of asexual development. *J. Cell Biol.* 128(4), 485-498.
- [17] Tsai, H.-F., Wheeler, M.H., Chang, Y.C., and Kwon-Chung, K.J. (1999) A developmentally regulated gene cluster involved in conidial pigment biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *J. Bacteriol.* 181(20), 6469-6477.
- [18] Wang, Z. and Sachs, M.S. (1997) Ribosome stalling is responsible for arginine-specific translational attenuation in *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biol.* 17(9), 4904-4913.

The tri-functional enzyme catalase-peroxidase (*cpeA*) is expressed during sexual development of *Aspergillus nidulans*

Mario Scherer, Ralf Liese and Reinhard Fischer*

Laboratorium für Mikrobiologie, Philipps-Universität Marburg and
Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Karl-von-Frisch-Str. D-35043 Marburg, Germany

*Corresponding Author

Key words: *Aspergillus nidulans*, oxidative stress, development, filamentous fungus, Hülle- cell

Abstract

Catalase-peroxidases are heme-containing enzymes described mainly in prokaryotes where they are induced under starvation conditions. They have catalase and peroxidase activity, although the substrates for the peroxidase reaction are largely unknown. We have characterized catalase-peroxidase of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. The corresponding gene, *cpeA* encodes a 81 kDa polypeptide with two conserved motifs for heme-coordination. The enzyme comprises of two similar domains suggesting gene duplication and fusion during evolution. The first 439 amino acids share 21 identical residues with the C-terminal 300 amino acids long part. Homologous proteins are found in *Neurospora crassa* (69% identical aa) sequencing project and other fungal genomes and in many prokaryotes, such as *Escherichia coli* HPI (61% identity). The *A. nidulans* enzyme has catalase, peroxidase and laccase activity. Expression analyses revealed that the gene is transcriptionally induced upon carbon starvation and during sexual development. A GFP fusion protein localized to the cytoplasm of Hülle-cells and primordia. Expression was dependent on the developmental regulator *stuA*. Besides transcriptional regulation we present evidence that posttranscriptional regulation and protein processing occurs.

***Aspergillus nidulans* α -1,3 glucanase (mutanase), *mutA*, is expressed during early stages of sexual development**

Huijun Wei¹, Mario Scherer¹, Archana Singh², Ralf Liese¹ and Reinhard Fischer^{1*}

¹Department of Microbiology, University of Marburg and Max-Planck-Institute for terrestrial Microbiology
Karl-von-Frisch-Str., D-35043 Marburg,, Germany

²Jawaharlal Nehru University School of Life Sciences, New Delhi, India

*Corresponding author

Abstract

In order to identify differentially expressed genes during fruitbody formation in *Aspergillus nidulans* we established a library using the suppressive subtractive hybridization (SSH) method. One of the clones displayed homology to fungal α -1,3 glucanases (mutanase). Since α -1,3 glucan is considered as main reserve material accumulated during vegetative growth as a cell wall component and consumed during sexual development, we analyzed this gene in detail. The gene is disrupted by 3 introns and encodes a putative protein of 48 kDa molecular mass. An N-terminal signal peptide suggests that the protein is being secreted. The protein displays 50 % identical amino acids to mutanases of other fungal origin. However, a proposed mutan binding domain characterized in e.g. *Penicillium* is not present in *A. nidulans*. To identify a biochemical function for the enzyme during fruitbody formation, the coding region of the *mutA* gene was replaced by the nutritional marker *argB*. Four independent deletion strains were analyzed but we did not observe any mutant phenotype under the conditions tested. However, mutanase transcript analysis demonstrated specific induction of the gene at the onset of sexual development. Transcriptional fusion with the *gfp* gene of *Aequoria victoria* revealed expression of the gene in older substrate hyphae and in Hülle cells. The clear developmental transcriptional regulation of the gene will allow to search for specific regulatory proteins and to establish the regulatory circuits underlying the developmental process.

Key words: spore formation, fungal development, fungal cell wall, fruitbody, Hülle cell

in Preparation

Lebenslauf

Name: Scherer, Mario
Geburtstag: 04.04.1971
Geburtsort: Zweibrücken
Familienstand: ledig

Ausbildung:

1977 – 1978 Grundschule Großseelheim
1978 – 1981 Gebr. Grimm Schule, Marburg
1981 – 1990 Martin-Luther-Schule, Marburg
12.06.1990 Abitur
August 1990 – Oktober 1991 Zivildienst
Oktober 1992 Beginn des Studiums der Biologie an der Philipps-
Universität Marburg

Oktober 1994 Vordiplom
Oktober 1996 Diplom-Hauptprüfung
Hauptfach: Mikrobiologie
Nebenfächer: Genetik, Biochemie, Immunologie

November 1996 – November 1997 Anfertigung einer Diplomarbeit im Labor von Prof. Dr.
R. K. Thauer unter Anleitung von Dr. R. Fischer am
Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie,
Marburg

Seit Februar 1998 Anfertigung einer Dissertation im Labor von Prof. Dr.
R. K. Thauer unter Anleitung von PD Dr. R. Fischer
am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie,
Marburg

Marburg, den